



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS A PARTIR DEL  
FRUTO DEL CRUCETILLO (*Randia aculeata*) Y  
LA EVALUACIÓN DE SUS EFECTOS SOBRE EL  
CRECIMIENTO DE *Mycobacterium bovis*.

### TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

### PRESENTA

NELSON DANIEL GARCIA CRUZ

### ASESOR:

Dra. Brenda Noemi Marquina Castillo

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2018.





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar el esfuerzo del presente trabajo a:

Dios el creador de este magnífico universo, a la madre tierra y a los seres espirituales de la naturaleza que me han permitido concluir exitosamente un capítulo más en mi vida y me han dotado de energía, paciencia y perseverancia para luchar y defender mis sueños, proyectos, ideales y que me han permitido desarrollar una visión diferente de la vida y de este mundo.

A mis padres Alfonso y Cristina por haberme apoyado incondicionalmente a lo largo de todos mis estudios, por cuidarme y estar conmigo en las etapas más difíciles de la vida. Les debo; la vida, lo que soy, lo que tengo y lo que pienso, jamás encontrare la manera de pagar toda una vida de sacrificios y desvelos que han hecho para que yo goce de vida, salud y sueños. Nada hubiera podido lograr sin el apoyo de ellos, por eso expreso mi respeto mi cariño y mi eterno agradecimiento por todo lo que han hecho para permitirme luchar por mis sueños.

A mis abuelos maternos y paterno Simón, Martha, Lupe y Carmen, que siempre me han dado su cariño y sus cuidados cuando más lo he necesitado, me han enseñado con el ejemplo los valores más importantes de la vida que nos hacen valer como seres humanos en este mundo.

A mis hermanas Nayely y Esmeralda por motivarme, ayudarme y brindarme su apoyo y cariño a cada instante, son las mejores personas que pudo el destino poner en mi camino para ayudarme a conseguir mis metas. Por último, a mi sobrina Lesly Azul por regalarme momentos increíbles de diversión y sonrisas que me sirven de alimento para recargar la mente y el espíritu de energía y motivación para terminar este tipo de proyectos.

Y a mis amigos de toda la vida, Yovanni e Ivan que me han acompañado y apoyado a lo largo de todos estos años en la universidad, siempre recordare todos los momentos vividos en aquel cuarto que compartimos; risas, desveladas, platicas y noches largas de estudio, jamás hubiera podido culminar esto sin la compañía y amistad de dos increíbles seres humanos.

El destino ha puesto grandes retos en mi vida que me han ayudado a formar carácter, la vida no es perfecta pero cada vivencia nos deja una enseñanza. La vida me ha enseñado que cualquier sueño se pueden lograr solo es cuestión de poner dedicación, esfuerzo y pasión al realizar las cosas. Estudiar en la UNAM fue un gran honor, un privilegio y un sueño hecho realidad, ahora toca seguir poniendo en alto el nombre esta increíble institución.

## **A G R A D E C I M I E N T O S**

Existe una gran cantidad de personas a las que quiero expresar mi agradecimiento por haber sido piezas clave para mi formación personal y para la culminación de este proyecto de investigación, a todos ellos les guardo un gran respeto, admiración y cariño por contribuir en mi formación académica y personal.

Quiero extender mi más sincero y profundo agradecimiento a:

El Dr. Antonio Verdugo Rodríguez del Laboratorio de Microbiología Molecular del departamento de microbiología e inmunología de la FMVZ UNAM, que fue la primera persona de ciencia que me abrió las puertas de su laboratorio y sembró en mi interior el interés por la investigación, estaré eternamente agradecido por su confianza y su ejemplo de cómo realizar investigación, apoyando y motivando el desarrollo de nuevos científicos.

A la Dra. Rachel Mata Essayag de la Facultad de Química UNAM por brindarme las facilidades para la obtención de los extractos y por enseñarme con el ejemplo que los científicos deben poseer grandes valores humanos como la humildad, pasión y actitud positiva para realizar investigación, lo cual es la clave del éxito y reconocimiento.

A la Dra. María Adelina Jiménez Arellanes de la Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales del Hospital Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, por haberme brindado todas las facilidades para realizar los estudios fitoquímicos de los extractos y de la planta. Estaré eternamente agradecido por todo el apoyo, la confianza y el tiempo dedicado en este proyecto. Aprendí el valor de la cooperación para realizar trabajos multidisciplinarios de calidad, me enseñó con el ejemplo que la disciplina, la eficiencia y la dedicación son la clave para lograr éxito y todas nuestras metas.

A la Dra. Julieta Luna Herrera del Laboratorio de Inmunoquímica II del Departamento de Inmunología de la ENCB del IPN, por abrirme las puertas de su laboratorio para la realización de los experimentos celulares y microbiológicos, estaré agradecido por abrirme

las puertas de su laboratorio y darme todo su apoyo, me ayudo a desarrollar las habilidades de la responsabilidad, la autonomía y la autodisciplina.

A al Dr. Rogelio Hernández Pando jefe de la sección de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubiran”, por abrirme las puertas su laboratorio durante todo este tiempo y por ser un ejemplo que seguir por su dedicación y profesionalismo que lo ha caracterizado en sus investigaciones realizadas en el área de tuberculosis, aprendí que el trabajo y el esfuerzo son fundamentales para conseguir el éxito.

A la Dra. Brenda Noemí Marquina Castillo de la sección de Patología Experimental del INCMNSZ, por ser mi asesora y por haberme aceptado desde el servicio social, estaré eternamente agradecido por haberme comprendido y apoyado durante todo este largo tiempo, agradezco la confianza depositada en mi persona y las facilidades que me concedió para trabajar autónomamente y en colaboración con los otros grandes investigadores que hicieron posible este trabajo, le guardo un gran sentimiento de respeto y cariño por ser la persona que me apoyo en mis decisiones y mis ideas incondicionalmente, su forma de trabajo me permitió crecer y desarrollar mis talentos y aumentar la confianza en mí mismo.

Por último, agradezco a todos mis amigos que a conocí en todos los laboratorios en los que trabajé por brindarme su amistad y su apoyo. A Octavio y Suhey del INCMNSZ por ser grandes amigos y apoyarme desde que inicie con la idea de este proyecto, también a María de Lourdes “Lulú” por brindarme su amistad, sin su ayuda y motivación jamás podría haberme atrevido a materializar este proyecto y a sus padres Víctor y Rosalía por el apoyo para la obtención de la planta. A Rene, Carmen y Mariana del CMN Siglo XXI por su amistad, apoyo y asesoría durante la realización de los experimentos, gracias por todos los consejos y la ayuda brindada. A Miguel, Irving, Bety y Pamela de la ENCB, IPN por su amistad y apoyo, en especial a Carol Mayte por toda la ayuda y asesoría que me brindo durante todo este tiempo y por ser una excelente amiga, muchas gracias.

# CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1.1 ANTECEDENTES	2
1.1.1 Herbolaria en México.	2
1.1.1.1 Extractos metanólicos de plantas medicinales mexicanas con actividad sobre micobacterias.	4
1.1.2 El Crucetillo ( <i>Randia aculeata</i> ) en la Medicina Tradicional.	6
1.1.2.1 Descripción botánica de la planta.	6
1.1.2.2 Taxonomía.	7
1.1.2.3 Usos etnobotánicos.	7
1.1.2.4 Estudios biológicos ( <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> ).	8
1.1.2.5 Estudios químicos.	9
1.1.3 Tuberculosis Bovina.	10
1.1.3.1 Importancia económica.	10
1.1.3.2 Epidemiología.	11
1.1.3.2.1 Distribución.	11
1.1.3.2.2 Prevalencia.	12
1.1.3.2.3 Zonas epidemiológicas.	13
1.1.3.3 Salud Pública.	14
1.1.3.3.1 Situación mundial de la tuberculosis zoonótica.	15
1.1.3.3.2 Situación en la tuberculosis zoonótica en México.	16
1.1.3.4 Agente etiológico	17
1.1.3.4.1 Taxonomía	17
1.1.3.4.2 Características	17
1.1.3.5 Hospedadores	19
1.1.3.6 Medio ambiente	20
1.1.3.7 Transmisión	21
1.1.3.7.1 Vías de eliminación	21
1.1.3.7.2 Vehículos	21
1.1.3.7.3 Vías de infección	22
1.1.3.8 Patogenia	23
1.1.3.9 Signos clínicos	25
1.1.3.10 Cambios morfológicos	26
1.1.3.11 Tratamiento	26
1.1.3.12 Prevención y Control.	27
1.1.3.13 Diagnóstico.	28
1.1.3.13.1 Prueba de la tuberculina.	28
1.1.3.13.2 Diagnóstico histopatológico.	29
1.1.3.13.3 Diagnostico bacteriológico.	30
1.1.3.13.4 Reconocimiento de ácidos nucleicos.	31
1.1.3.13.5 Prueba de gama interferón.	31
1.1.3.13.6 Toma y envió de muestras.	32

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
1.3 JUSTIFICACIÓN	34
1.4 OBJETIVOS DEL TRABAJO	35
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	36
2.1 PROCEDIMIENTOS BOTÁNICOS	36
2.1.1 Material vegetal.	36
2.2 PROCEDIMIENTOS QUÍMICOS	36
2.2.1 Obtención de extractos.	36
2.2.2 Cromatografías de capa fina (CCF).	37
2.2.3 Cuantificación de fenoles totales en los extractos.	38
2.3 PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS Y CELULARES	40
2.3.1 Cultivo de la cepa AN5 de <i>Mycobacterium bovis</i> .	40
2.3.2 Determinación de la actividad antimicobacteriana de los extractos de mediante el método de MABA.	40
2.3.3 Cultivo y preparación de macrófagos J774A.1 para la realización de experimentos.	41
2.3.4 Ensayo de citotoxicidad mediante el método de azul de tripano.	42
2.3.5 Ensayo de citotoxicidad mediante el método de resazurina.	43
2.3.6 Ensayo de killing con <i>Mycobacterium bovis</i> cepa AN5 en macrófagos J774A.1.	44
<b>RESULTADOS</b>	46
3.1 ENSAYOS BOTÁNICOS	46
3.1.1 Material vegetal.	46
3.2 ENSAYOS QUÍMICOS	46
3.2.1 Obtención de extractos a partir de los frutos de <i>Randia aculeata</i> .	46
3.2.2 Análisis fitoquímico.	46
3.2.3 Cuantificación de fenoles totales en los extractos mediante el método de Folin-Ciocalteu.	47
3.3 ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS Y CELULARES	47
3.3.1 Determinación de la actividad antimicobacteriana de los extractos de <i>Randia aculeata</i> mediante el método MABA (Microplate Alamar Blue Assay) modificado.	47
3.3.2 Determinación de la citotoxicidad de los extractos mediante la técnica de azul de tripano.	49
3.3.3 Determinación de la citotoxicidad de los extractos mediante el método de resazurina.	49
3.3.4 Ensayo de killing para evaluar el efecto inmunomodulador de los extractos.	50
<b>DISCUSIÓN</b>	52
<b>REFERENCIAS</b>	56
<b>IMÁGENES</b>	61
<b>FIGURAS</b>	65
<b>CUADROS</b>	71

## RESUMEN

GARCIA CRUZ NELSON DANIEL. Obtención de extractos a partir del fruto del crucetillo (*Randia aculeata*) y la evaluación de sus efectos sobre el crecimiento de *Mycobacterium bovis* (bajo la dirección de: Dra Brenda Noemi Marquina Castillo).

**Justificación:** *Mycobacterium bovis* es una bacteria zoonótica que genera un importante número de muertes humanas alrededor del mundo y una gran pérdida económica en los establos lecheros, actualmente no existe tratamiento eficaz para el ganado bovino. Los frutos del Crucetillo se usan tradicionalmente como descongestionador, analgésico, antiinflamatorio y para tratar casos de bronquitis, reumatismo y artritis. Existen escasas investigaciones científica que estudien sus propiedades. Plantas del mismo género (*Randia*) han demostrado propiedades antimicrobianas, inmunoestimulantes y antioxidantes. Estudiar las propiedades antimicrobianas e inmunomoduladora de esta planta son de interesante para identificar nuevos compuestos terapéuticos. **Objetivo:** Obtener extractos crudos a partir del fruto del crucetillo con diferentes solventes y evaluar sus efectos sobre el crecimiento de *M. bovis* cepa AN5 en cultivo bacteriano y macrófagos murinos. **Metodología:** Se realizó la extracción de los extractos mediante la técnica de maceración con Metanol o Etanol. La actividad antimicobacteriana fue evaluada mediante el método de MABA (Microplate Alamar Blue Assay) modificado y el crecimiento intracelular fue evaluado con el ensayo de Killing. **Resultados:** Se obtuvo un porcentaje de rendimiento del 17.8 % con MeOH y 7.0% con EtOH. Ambos extractos no mostraron actividad antimicobacteriana a concentración de 400 µg/mL. Los extractos no disminuyeron el crecimiento intracelular de *M. bovis* en ninguna de las concentraciones (10, 50, 100 µg/mL) y por el contrario favorecen la supervivencia de la bacteria, existiendo diferencias estadísticamente a partir de 50µg/mL en ambos casos. El análisis estadístico de los datos fue realizado mediante un ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

# INTRODUCCIÓN

## 1.1 ANTECEDENTES

### 1.1.1 Herbolaria en México.

La herbolaria puede entenderse como la botánica aplicada a la medicina, se considera herbolaria o fitoterapia al uso de plantas o sus extractos con fines terapéuticos para prevenir o curar enfermedades (1).

Las plantas medicinales siempre han estado presentes dentro de la cultura y sociedad mexicana, la herbolaria en México tiene sus orígenes en las antiguas civilizaciones prehispánicas que se desarrollaron a lo largo del territorio mexicano (como la Olmeca, Maya, Mexica-Azteca, Tolteca, Teotihuacana, Zapoteca, Mixteca, Tlaxcalteca, Totonaca, Chichimeca y otras), en todas estas culturas las plantas medicinales jugaron un papel importante para mantener y restaurar la salud de sus poblaciones por esta razón tenían un amplio conocimiento de sus propiedades terapéuticas (2).

El imperio azteca dejó una huella física, donde se refleja la importancia de las plantas en su vida cotidiana. Nezahualcóyotl y Moctezuma mandaron construir jardines botánicos durante sus gobiernos, los más importantes fueron el jardín de Tetzcotzingo (Texcoco) y el de Huaxtepetl (Oaxtepec); en los cuales se cultivaba una gran diversidad de plantas medicinales y de ornato traídas de diversas regiones del país. La finalidad de estos jardines era principalmente ornamental y también se buscaba la domesticación de plantas silvestres para fortalecer su estudio y ampliar el conocimiento sobre sus propiedades terapéuticas para ser aplicadas de manera más eficiente en la medicina de la cultura mexicana (2).

En México los conocimientos sobre la medicina herbolaria se han mantenido vivos en la sociedad durante muchas generaciones por medio de la trasmisión oral principalmente; sin embargo, este método ha generado la pérdida de mucha información relevante sobre el uso, las dosis y los métodos de preparación de las plantas medicinales, así como sus formas de aplicación para curar o prevenir distintas enfermedades. Los escritos antiguos que contenían los conocimientos sobre medicina, herbolaria, astronomía, astrología y matemáticas que había sido escritos por las culturas prehispánicas, fueron destruidas por la santa inquisición durante el proceso de colonización de América para imponer su nueva religión, cultura, forma de gobierno y creencias. La destrucción de estos textos produjo la pérdida de mucha información valiosa adquirida durante cientos de años en diversas áreas del conocimiento, generando así un retroceso sobre el conocimiento y el desarrollo de la sociedad actual, impidiendo tener un mejor entendimiento de nuestro mundo y de la medicina herbolaria practicada en aquellos tiempos. El libro conocido comúnmente como “El códice de la Cruz-Badiano” cuyo título en latín es “*Libellus de medicinalibus indorum herbis*” que se traduce al español como “Libro de las hierbas medicinales de los indios”, es un libro que permitió recuperar un poco del conocimiento perdido sobre medicina herbolaria practicada en el México antiguo. Es el primer libro documentando oficialmente donde se describe las propiedades curativas de las plantas americanas empleadas por los mexicas. Fue escrito inicialmente en idioma náhuatl por el médico indígena Martín de la Cruz y posteriormente traducido al latín por Juan Badiano, quien terminaría de escribirlo el 22 de julio de 1552. En este libro se describe cómo realizaban las preparaciones, la forma de administración y los principales usos que se le daba a cada planta. El código describe 227 plantas medicinales, de las cuales 185 están dibujadas y 64 son mencionadas por el nombre (1,3). El códice estuvo extraviado durante 400 años, fue encontrado en la biblioteca del vaticano y actualmente se

encuentra resguardado y conservado en el museo nacional de antropología e historia de México (1). El Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en la década de los años 60's realizó una edición de este libro en español, lo cual estimuló el interés por el estudio de las plantas medicinales en México por parte de los investigadores nacionales e internacionales; sin embargo, aún existen muchas plantas medicinales cuyo potencial curativo no se ha estudiado a profundidad, solo una pequeña cantidad han sido estudiadas con rigor científico. México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas con 4,500 especies tan sólo después de China que tiene 5,000 plantas registradas y en tercer lugar se encuentra Colombia con 2,600 plantas (4). A pesar de la riqueza que México tiene en cuanto a plantas medicinales es escasa la investigación científica que se realizan en esta área con el fin de avalar y respaldar el uso de la herbolaria para curar y prevenir enfermedades o para conocer los efectos adversos que podrían ocasionar el uso no controlado o desmedido de las plantas tanto en animales como en el ser humano.

### ***1.1.1.1 Extractos metanólicos de plantas medicinales mexicanas con actividad sobre micobacterias.***

Hablando más específicamente sobre plantas medicinales y las micobacterias, existe una importante cantidad de investigaciones en busca de nuevos antibióticos capaces de controlar las infecciones generadas por las bacterias del género *Mycobacterium*; sin embargo, la mayoría de las investigaciones se han enfocado solo en evaluar extractos orgánicos y los compuestos naturales sobre cepas de *M. tuberculosis* en especial la cepa H37Rv (5–8). Pero pocos son los estudios donde se evalúan los efectos sobre las cepas de *M. bovis* que es la especie de mayor importancia en el área veterinaria debido al problema de salud que genera en el ganado bovino y su amplia distribución en diversas especies animales.

A la fecha, se ha descrito la actividad de algunos extractos metanólicos provenientes de plantas medicinales mexicanas y han demostrado interesante actividad en contra de algunas cepas del género *Mycobacterium*. Investigaciones realizadas con extractos de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (1:1) de plantas mexicanas como *Phoradendron robinsonii*, *Larrea divericata* y *Amphiteryngium adstringens* inhibieron el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv en un 99, 100 y 95 % respectivamente, a una concentración de 50 µg/mL (6). Los extractos MeOH de *Ambrosia confertiflora*, *A. ambrosioides* y *Guaiacum coulteri*, presentaron valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de 200, 790, y 1000 µg/mL respectivamente, sobre la cepa H37Rv (5). El extracto MeOH obtenido de la raíz de *Leucophyllum frutescens* presentó una CMI de 62.5 µg/m sobre la cepa H37Rv (6).

En México es escasa la cantidad de artículos científicos publicados donde se evalúa la actividad de extractos MeOH o compuestos puros aislados de plantas medicinales mexicanas sobre *M. bovis*. En otros países del mundo se ha encontrado algunos extractos y compuestos con importante actividad antibacteriana sobre cepas de *M. bovis*. Estudios realizados en Etiopia con extractos MeOH de 5 plantas medicinales empleadas para tratar enfermedades respiratorias, *Calpurnia aurea*, *Ocimum basilicum*, *Artemisa abyssinica*, *Croton macrostachyus* y *Eucalyptus camaldulensis*, mostraron tener actividad contra tres cepas de *M. bovis* (SB1176, SB1953, SB133), cuyos valores de CMI fueron de 12.5-75, 25-50, 12.5-50, 25-50 y 12.5-50 µg/mL respectivamente (9). Algunos compuestos con importante actividad antimicobacteriana; son los aislados del aceite esencial como el timol, el carvacrol y el ácido cinámico, los cuales presentaron valores de CMI de 2.02, 5.2 y 7.29 µg/mL respectivamente, sobre la cepa AN5 de *M. bovis* (10).

### **1.1.2 El Crucetillo (*Randia aculeata*) en la Medicina Tradicional.**

El “Crucetillo” es una planta muy conocida en varias localidades y mercados del estado de Veracruz, es también conocida con el nombre de Crucillo, Tintillo o Crucetillo hembra, su nombre científico es *Randia aculeata*. Esta planta se encuentra distribuida desde Florida en los Estados Unidos de América, pasando por los estados del sureste mexicano principalmente Veracruz, Guerrero, Chiapas, Oaxaca, Yucatán y Tabasco y puede encontrarse en algunos países de Centro América (11). Sus frutos son tradicionalmente usados en seres humanos y animales domésticos para contrarrestar los efectos adversos producidos por la mordedura de serpientes venenosas de la región (principalmente *Bothrops asper* conocida como “Nauyaca”) y otros animales ponzoñosos como escorpiones, abejas, avispas y arañas (12,13).

#### ***1.1.2.1 Descripción botánica de la planta.***

El Crucetillo (*R. aculeata*) es un árbol arbustivo de 2 a 6 metros de altura, se reproduce generalmente por semilla y la planta hembra siempre da origen por vía asexual a una planta macho cerca de ella que le servirá como polinizador. Su tallo es leñoso muy ramificado y generalmente posee espinas de 0.5 a 1.5 cm de largo. Sus hojas son laminas foliares obovado-orbiculares glabras de ambas caras, miden de 10 -13.5 cm de largo por 5 -6 cm de ancho, están apareadas en nudos separados o agrupadas en espolones, tiene un ápice obtuso, base redonda o atenuada, poseen peciolo de 0.2 a 0.9 mm de largo (11). Sus flores son terminales de color blanco, miden de 2 a 3 mm de largo, presentan un cáliz con 5 lóbulos lineares a ovados de 0.3 a 0.4mm de largo y el limbo de 1mm de largo (11). Florece en los meses de mayo y noviembre y fructifica en julio y febrero. Su fruto es globoso liso de color negro azulado, mide de 1.8-2.5 cm de ancho por 2.8-3.5 cm de largo, en su interior contiene de 8 a 10 semillas comprimidas suborbiculares de color negro, que miden de 6 a 8 mm por lado.

### ***1.1.2.2 Taxonomía.***

**Reino:** *Plantae*

**Subreino:** *Tracheobionta*

**Division:** *Magnoliophyta*

**Clase:** *Magnoliopsida*

**Subclase:** *Asteridae*

**Orden:** *Gentianales*

**Familia:** *Rubiaceae*

**Subfamilia:** *Ixoroideae*

**Tribu:** *Gardeniaeeae*

**Género:** *Randia*

**Especie:** *Randia aculeata*

### ***1.1.2.3 Usos etnobotánicos.***

Tradicionalmente se realiza una preparación etanólica utilizando siete frutos de crucetillo realizando con un corte en forma de cruz sobre ellos para ser sumergidos durante por lo menos siete días en un litro de aguardiente o vino de jerez antes de ser usado (12–14). Esta preparación es utilizada en la región sureste del país como un botiquín de emergencia, tanto en los seres humanos como en los animales domésticos en caso de ser accidentalmente atacados por una serpiente venenosa cuando salen a realizar sus actividades de trabajo en el campo o se encuentran muy lejos de hospitales que cuenten con antídotos contra el veneno de serpiente. También se ha reportado el uso de este extracto etanólico como analgésico, antiinflamatorio y en menor frecuencia se emplea para tratar enfermedades crónicas como cáncer y diabetes reportando un efecto inmunomodulador (12,14). El extracto etanólico de *R. aculeata* también es utilizado como descongestionador, antihemorrágico y antidiarreico, según las experiencias de los consumidores (15). Así también se emplea para el tratamiento de diversos malestares como anemia, bronquitis, reumatismo, artritis, hemorroides, problemas de la circulación y en Guerrero se emplean el fruto como abortivo (12,15).

#### ***1.1.2.4 Estudios biológicos (in vitro e in vivo).***

Existen pocos estudios científicos que avalan el uso de esta planta para tratar todas las enfermedades para la cuales se utilizan, además de existir pocas investigaciones que analicen los efectos adversos de su consumo. En un estudio realizado para evaluar el efecto protector *R. aculeata* en contra del veneno de serpiente se utilizaron ratones machos CD1 (20-25 g) y se inocularon intramuscularmente con veneno de *B. asper* a dosis de 1mg/kg, inmediatamente después fueron tratados con una dosis inicial de 10 mL/kg (aproximadamente 200-250  $\mu$ L dependiente del peso) de la preparación etanólica de *R. aculeata* por vía oral y 4 dosis posteriores de 5 mL/kg (100-125  $\mu$ L) en intervalos de una hora, se observó que la mortalidad disminuía al 12.5% en el grupo de ratones tratados con la planta, mientras que el grupo testigo sin tratamiento presentó una mortalidad de 37.5%. El grupo de ratones inoculados con veneno y tratados con el extracto presentaron mayores niveles de hemoglobina, glóbulos rojos y hematocrito en comparación con el grupo testigo sin tratamiento. También se observó una disminución parcial del daño y la necrosis tisular en el músculo esquelético y cardiaco provocado por el veneno de serpiente (12). En otro estudio realizado en ratas macho de la cepa Wistar se evaluó el efecto analgésico de la preparación etanólica de *R. aculeata* en un modelo de dolor visceral inducido con ácido acético, se administraron los tratamientos 30 minutos antes de la aplicación intraperitoneal de ácido acético y se contabilizaron el número de contorsiones de los animales durante un periodo de 30 minutos, se observó que la dosis de 100mg/kg del extracto etanólico era capaz producir un efecto analgésico similar a la administración de 500 mg/kg de paracetamol (fármaco de referencia). También se evaluó la toxicidad aguda del extracto etanólico por vía oral en ratas Wistar macho y se determinó que no presenta toxicidad a dosis de 100 mg/kg por vía oral en este modelo (14).

### ***1.1.2.5 Estudios químicos.***

No hay estudios publicados en los que se determine la composición química de los extractos obtenidos a partir del crucetillo (*R. aculeata*). Sin embargo, en otros países se han estudiado más a fondo algunas plantas pertenecientes al mismo género, por ejemplo, en extractos obtenidos de *Randia dumetorum*, *Randia spinosa*, y *Randia uliginosa* se han identificado la presencia de alcaloides, taninos, compuestos fenólicos, flavonoides y saponinas (16–19). Fitoesteroles en extractos de *R. spinosa* y *R. dumetorum* (18,20). Glucósidos, terpenoides, triterpenoides glicósidos y cumarinas en *R. dumetorum* (18,19). Cabe mencionar que las planta anteriormente mencionadas son empleadas en diferentes partes del mundo para tratar padecimientos similares a los que se han reportado para el crucetillo (*R. aculeata*). El fruto de *R. dumetorum* posee propiedades analgésicas y antiinflamatorias; es empleado para tratar abscesos, úlceras, heridas, tumores, enfermedades de la piel, asma y rinitis(18,19). Los extractos de *R. spinosa* demostraron que poseen actividad antiinflamatoria, antitumoral, antimicrobiana, antipirética, anticonceptiva e inmunoestimulante; es empleado para tratar casos de bronquitis, asma y enfermedades neurodegenerativa, además se prescribe en algunos países para el tratamiento de mordedura de serpiente y escorpión en combinación con otros fármacos (21,22). Por su parte el extracto EtOH de *R. uliginosa* ha demostrado poseer actividad microbicida, antioxidante, afrodisíaca y cardiotónica; se emplea para tratar enfermedades como diabetes mellitus, desordenes gastrointestinales, helmintiasis y en caso de envenenamiento con peces venenosos (16,17).

### **1.1.3 Tuberculosis Bovina.**

La tuberculosis bovina es causada por la bacteria *Mycobacterium bovis*, es una enfermedad infectocontagiosa de curso crónico debilitante, aunque en ocasiones puede presentarse en forma aguda. Es caracterizada por la formación de granulomas nodulares conocidos como tubérculos en distintos órganos y tejidos. Las lesiones se observan con mayor frecuencia en pulmones y ganglios linfáticos del área de la cabeza y tórax. Sin embargo, también se pueden encontrar lesiones en hígado, bazo, intestino, riñones, pleura y peritoneo (23–25). La presencia de esta enfermedad es más frecuente en los países en vías de desarrollo debido a las escasas medidas de prevención y control que se han puesto en marcha en esos países para erradicarla. La formación de lesiones granulomatosas en diversos órganos afecta la condición física y productiva de los animales, ocasionando importantes pérdidas económicas (25,26).

#### ***1.1.3.1 Importancia económica.***

El interés de luchar en contra de la tuberculosis bovina se justifica principalmente por el riesgo que implica para la salud pública y las pérdidas económicas que genera en el sector ganadero. Las principales pérdidas económicas son ocasionadas por la disminución en la producción láctea de los animales enfermos, decomisos parciales o totales de las canales en mataderos, restricciones en la movilización y comercialización de productos lácteos y cárnicos a nivel nacional o internacional, muerte o matanza de los animales infectados por *M. bovis*, pérdida de acuerdo comerciales y gastos en pruebas diagnósticas (26–28). No existe un cálculo exacto de las pérdidas económicas que genera la tuberculosis bovina en México, sin embargo, a nivel mundial se estima que existen unos 50 millones de bovinos infectados los cuales generan pérdidas anuales de 3,000 millones de dólares por todas las razones anteriormente mencionadas(29).

La exportación de ganado bovino en pie a los Estados Unidos de América equivale a unos 450 millones de dólares anuales (25). Este comercio puede verse afectado por la alta incidencia de tuberculosis bovina en México, ocasionando restricciones o cierre de fronteras para las exportaciones de ganado provenientes de hatos o zonas no libres de tuberculosis bovina. En animales infectados con *M. bovis* la producción de leche puede verse disminuida en un 17% (25). Además la leche proveniente de una vaca excretora de micobacterias puede contaminar grandes cantidades de leche en los tanques de almacenamiento o transporte, aumentando de esta manera las pérdidas económicas y el riesgo de infección (30).

En el año 2016 alrededor de 11 mil 607 millones de litros de leche fueron producidos en México y cerca del 30-40 % de esa leche o sus productos derivados se comercializó sin un proceso de pasteurización (31,32). La mayor parte de la leche sin pasteurizar se comercializa de manera local en los estados y municipios de todo el país para su consumo directo o para la producción de derivados lácteos como quesos, yogurt, crema, nata, requesón, etc. Todo lo anterior implica un riesgo para la salud pública en regiones donde la prevalencia de tuberculosis bovina es elevada y la leche no es hervida o pasteurizada para su consumo.

### ***1.1.3.2 Epidemiología.***

#### **1.1.3.2.1 Distribución.**

La distribución de la tuberculosis bovina es prácticamente mundial, aunque actualmente se clasifican algunos países como libres tal es el caso de Australia, Islandia, Dinamarca, Suecia, Noruega, Finlandia, Austria, Suiza, Luxemburgo, Letonia, Eslovaquia, Lituania, Estonia, Republica Checa, Canadá, Singapur, Jamaica, Barbados e Israel (26).

### **1.1.3.2.2 Prevalencia.**

De acuerdo con algunos reportes publicados por el SENASICA en el año 2017 en México se reportó una prevalencia de tuberculosis bovina aproximada del 1% de acuerdo con los resultados obtenidos mediante la prueba de tuberculina. En el informe se evaluaron 9,647,519 bovinos de los cuales resultaron reactores a la prueba 96,455 animales distribuidos en diversas regiones del país. Los estados con mayor número de casos positivos son Chihuahua con 30,940 casos, la región lagunera con 26,820 casos, Michoacán 10,480 casos, Chiapas 7,860 casos, Nuevo León 4,327 casos y Veracruz con 4, 287 casos. Es importante resaltar que la verdadera prevalencia de tuberculosis bovina en el país aún es desconocida ya que existen una gran cantidad de áreas geográficas que no han sido evaluadas y en muchos estados solo una pequeña cantidad de los bovinos existentes han sido analizado. En algunos reportes de la Unión Ganadera Regional de Jalisco se observa una elevada prevalencia de tuberculosis bovina en algunas áreas geográficas por ejemplo en la región central de Jalisco se estima un 8% y en la región de los Altos de Jalisco hasta un 16.6% (33). México en el año 2017 contaba con un total de 32.22 millones de bovinos aproximadamente, de los cuales, 29.6 millones era ganado destinado a producir carne o de doble propósito y 2.62 millones eran ganado productor de leche (34). Por lo tanto, el diagnóstico de 9.65 millones de animales reportados en el informe aun no es suficiente para conocer el verdadero estatus nacional con respecto a esta enfermedad. Es importante recordar que la prueba de tuberculina no es 100% confiable para detectar animales infectados o excretadores, ya que existen animales negativos a la prueba y sin embargo es posible aislar micobacterias a partir de estos animales.

### 1.1.3.2.3 Zonas epidemiológicas.

De acuerdo con la NOM-031-ZOO-1995 referente a la campaña nacional contra la tuberculosis bovina, se contempla la clasificación de las zonas geográficas del país de acuerdo con la prevalencia de tuberculosis bovina presente en cada región (25).

1. **Zona de control:** Área geográfica donde la prevalencia de la enfermedad es mayor al 2 % o desconocida y se realizan medidas zoonosanitarias con tendencia a disminuir la incidencia o prevalencia de la tuberculosis bovina en la zona, como por ejemplo control de la movilización, constatación progresiva de hatos, eliminación de animales reactivos.
2. **Zonas de erradicación:** Área geográfica donde la prevalencia de la enfermedad es menor al 2% y se realizan medidas zoonosanitarias tendentes a la eliminación total de la tuberculosis bovina, como por ejemplo control estricto de movilización, monitoreo de rastros y mataderos, eliminación de animales reactivos y constatación del 100% de los hatos para conocer la prevalencia de la zona.
3. **Zonas libres:** Área geográfica donde todos los hatos existentes del área han sido analizados y no se han registrado ningún caso de la enfermedad en los últimos 5 años, en estas áreas se ha logrado eliminar la tuberculosis bovina por lo tanto las medidas zoonosanitarias están enfocadas a evitar el reintegro de la enfermedad a la zona o eliminar cualquier caso de infección que se reporte, tener un patrón actualizado de productores, control estricto de la movilización, contar con un programa continuo de monitores en las producciones y en los mataderos.

### ***1.1.3.3 Salud pública.***

Por su capacidad de infectar al ser humano a través de la inhalación de aerosoles o ingestión de leche contaminada, *M. bovis* es considerada una importante bacteria zoonótica capaz de generar tuberculosis en humanos de manera similar que en animales (26). Los niños y adolescentes han demostrado ser más susceptibles a infectarse con *M. bovis* principalmente en áreas rurales (30,56). En otros tiempos hasta el 40 % de los casos de tuberculosis extrapulmonar y meníngea eran ocasionados por infecciones de origen bovino (30). Existe un mayor riesgo de infección en trabajadores rurales que procesan productos lácteos en zonas de alta prevalencia de tuberculosis y personas que manipulan carne principalmente carniceros, personal de matanza en rastros y personas que practican la cacería y el curtido de pieles, así como también médicos veterinarios que realizan manejo de ganado o inspección sanitaria en zonas de alta prevalencia (30).

La pasteurización de la leche y las campañas para la erradicación de la tuberculosis bovina han reducido considerablemente la incidencia de tuberculosis humana provocada por *M. bovis*, sin embargo, existen una gran cantidad de países donde persiste la costumbre de beber leche bronca (no hervida) y sus productos derivados como son la crema, el queso y la nata (30). México no es la excepción a este tipo de prácticas debido a diversos factores sociales, culturales y económicos. Además, en algunos países del mundo en especial en la región de África y Asia existen la comercialización de carne, pieles y cacería de animales salvajes que son huéspedes comunes o incidentales de *M. bovis* y *M. tuberculosis* lo cual aumenta el riesgo de contraer esta enfermedad zoonótica.

### 1.1.3.3.1 Situación mundial de la tuberculosis zoonótica.

A nivel mundial en el año 2015 alrededor de 149,000 casos de TB en humanos causada por *M. bovis* fueron reportados, la mayor cantidad de estos fueron en África 76,300 casos y el sureste asiático 47,400 casos. Con respecto al número de muertes a nivel mundial se reportaron alrededor de 13,400 muertes de las cuales 10,000 fueron en la región de África y 2,280 casos en el sureste asiático (60). El promedio mundial de tuberculosis zoonótica fue de 1.5% en el periodo del 2014-2015. Los países con mayor incidencia fueron Zimbabwe 11%, Lesotho 7%, Tanzania 6.8%, Etiopia 6.7%, Namibia 6.2%, Kenya 5% y la Federación Rusa 4.2%. En América solo fueron reportados 804 casos y 46 muertes a causa de *M. bovis* (60). En naciones desarrolladas alrededor del 2% de los casos de TB pulmonar en humanos es causada por *M. bovis*, sin embargo, el consumo de leche pasteurizada en estos países es generalizada (28,56).

En algunos estudios realizados en Etiopia a partir de muestras de esputo de pacientes positivos a TB, se identificó la presencia de *M. bovis* en un rango del 16.3% hasta 29.2% de las muestras analizadas. En India se analizaron muestras de fluido cerebroespinal provenientes de pacientes con TB meníngea mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando secuencias específicas para detectar una diferencia de 27 pares de bases en el gen *hupB* que permite diferenciar a *M. bovis* y *M. tuberculosis*, el 17% de las muestras fueron positivas a *M. bovis*, el 2.7% a *M. tuberculosis* y 13.4% de las muestras fueron indicaron la presencia de una infección dual (61). Una de las mayores barreras para conocer la verdadera incidencia de tuberculosis ocasionada por *M. bovis* en humanos es el diagnóstico, en muchos laboratorios del mundo no se diferencia entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* debido al uso de la tinción de Ziehl-Neelsen como método único de diagnóstico generando un subdiagnóstico de los casos ocasionados por *M. bovis* (56,60).

### 1.1.3.3.2 Situación en la tuberculosis zoonótica en México.

En México hasta 6% de los casos de TB en humanos son debidos a *M. bovis* con una alta proporción de TB extrapulmonar (62). En un análisis retrospectivo realizado el Instituto Nacional de Ciencia Médicas y Nutrición Salvador Zubiran con 533 muestras de biopsias humanas que fueron positiva a cultivo de *M. bovis* o *M. tuberculosis* durante el periodo del año 2000-2015 y que posteriormente fueron identificadas mediante espolingotipificación se observó que 372 muestras (69.7%) fueron positivas a *M. tuberculosis* y 161 muestras (30.2%) a *M. bovis*. De los casos referentes a tuberculosis extrapulmonar el 41.6 % fue ocasionado por *M. bovis* y el 30.1 % por *M. tuberculosis*, en el caso de tuberculosis pulmonar se observó un 36 % ocasionado por *M. bovis* y un 52.6% por *M. tuberculosis* (36). En un estudio realizado en el estado de Querétaro con 255 muestras (174 esputo, 63 orina, 8 jugo gástrico y 10 varios tejidos) de pacientes con síntomas de TB se identificó por medio de espolingotipificación 74 muestras positivas de las cuales 78% de ellas fueron positiva a *M. tuberculosis* y 6.7% a *M. bovis* (48). En el estado de Jalisco se analizaron 124 aislados de seres humanos con TB obtenidos durante el periodo del año 1995-2005 con la técnica de PCR utilizando el gen *oxyR* (utilizado para identificar *M. bovis*), se identificaron 35 muestras positivas a *M. bovis* (28%). De los 35 pacientes positivos a *M. bovis* el 74 % de ellos presento TB extrapulmonar, 51% fueron niños, 69% presentaban malnutrición, 51 % había consumido leche no pasteurizada en algún momento de la vida, 6% tenía contacto directo con animales, 31% de ellos murieron y 12 muestras de las 35 eran muestras de fluido cerebroespinal proveniente de pacientes con TB meníngea (33). En los estudios anteriormente citados se identifica la presencia de *M. bovis* en un porcentaje considerable de las muestras analizadas demostrando la relevancia de esta bacteria en la salud pública de México y el mundo, por lo que se requiere mejorar el diagnóstico en los laboratorios para conocer la situación real de *M. bovis* en la población nacional y mundial.

#### **1.1.3.4 Agente etiológico.**

*Mycobacterium bovis* es la bacteria responsable de causar tuberculosis en una gran cantidad de animales domésticos y salvajes. Por su capacidad de infectar al ser humano a través de productos lácteos contaminados es considerada una importante zoonosis que afecta la salud pública, además es considerada la segunda bacteria de mayor importancia del complejo *Mycobacterium tuberculosis* que engloba las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. canetti* y *M. mungi* (25,28,35).

##### **1.1.3.4.1 Taxonomía.**

**Filo:** *Actinobacteria*

**Orden:** *Actinomycetales*

**Familia:** *Mycobacteriaceae*

**Género:** *Mycobacterium*

**Especie:** *Mycobacterium bovis*

##### **1.1.3.4.2 Características.**

*Mycobacterium bovis* es una bacteria clasificada como ácido alcohol resistente debido a la presencia de ácidos micólicos en su pared que le confieren esta característica tintorial, además le permite tener resistencia ante algunos antibióticos convencionales y evadir mecanismos de defensa del sistema inmunológico (26). Es un bacilo intracelular facultativo, no formador de esporas, inmóvil, capsulado y aerobio obligado (24).

Mide aproximadamente de 0.3- 0.6  $\mu\text{m}$  de diámetro y 1.5-3  $\mu\text{m}$  de longitud, presentan sus colonias una morfología lisa, crecimiento disgónico y es resistente a la pirazinamida (35–37). En las pruebas bioquímicas es negativo a la producción de niacina, reducción de nitratos y crecimiento en ácido 2-tiofencarboxílico (35). Está considerado como un microorganismo del grupo de riesgo III, dicho grupo de patógenos se caracterizan por representar un riesgo

individual elevado y poblacional bajo, provocan enfermedades graves en los seres humanos y animales, pero ordinariamente no se propaga de un individuo a otro, existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces para atacarlo y de acuerdo con el centro para el control y prevención de enfermedades (CDC) se requieren un nivel de bioseguridad 3 para su manipulación (38).

La envoltura de las micobacterias es muy compleja y resalta la gran presencia de lípidos, su estructura general es la membrana externa, la pared celular y la membrana plasmática (39).

La membrana interior de las micobacterias es una bicapa lipídica con presencia de proteínas transmembranales a ella se le unen la lipoarabinomanana y lipomanana que forman el periplasma, Posteriormente se encuentran el peptidoglicano formado por unidades alternadas de N-acetilglucosamina y ácido N-glicolilmurámico unidos por enlaces fosfodiéster a cadenas de arabinogalactanos los cuales se unirán a los ácidos micólicos característicos de las micobacterias, que están compuestos de ácidos grasos  $\alpha$ -ramificados y  $\beta$ -hidroxilados de cadena larga (70-90 carbonos) y estos a su vez se asocian a glicolípidos que representan hasta el 25% del peso de la bacteria (39,40).

Otra característica importante de *M. bovis* es la incapacidad de utilizar el glicerol como fuente de carbono en comparación con *M. tuberculosis* que sí lo hace, esto debido a la carencia funcional de la enzima piruvato quinasa (PK) causada por una mutación en el gen *pykA* que codifica para esta enzima lo que ocasiona un bloqueo en la generación de ATP por medio de la glicólisis y la ruta de la pentosa fosfato de esta manera los carbohidratos son incapaces de actuar como fuente de carbono por lo tanto los lípidos y la vía de la gluconeogénesis toma relevancia en el crecimiento in vitro de esta bacteria, por lo tanto se requiere complementar los medios de cultivo con piruvato de sodio para proporcionar una fuente alterna de carbono a la bacteria (41).

*M. bovis* puede sobrevivir varios meses en el medio ambiente, particularmente en lugares fríos, oscuros y húmedos a temperatura de 12-24°C, el tiempo de supervivencia puede variar de 18 a 322 días dependiendo de la exposición a la luz solar, por lo tanto este microorganismo es frecuentemente aislado a partir de los suelos y pasturas (26).

### **1.1.3.5 Hospedadores.**

El ganado bovino es considerado el principal hospedero para *M. bovis* pero también pueden ser infectados otros animales. Los principales huéspedes conocidos que mantienen la infección son la mayoría de las especies de bovinos, alces, kudu, búfalo cafre, eland, babuinos, el púsum de cola de escoba, tejones y los ciervos cola blanca (26,30).

Los huéspedes accidentales incluye: ovejas, cabras, caballos, cerdos, perros, gatos, hurones, camellos, llamas, ciervos, antílopes, elefantes, rinocerontes, jirafas, zorros, coyotes, bisontes, primates no humanos (mono araña, mono Rhesus), nutrias, focas, leones marinos, liebres, mapaches, osos, jabalíes verrugosos, zarigüeyas, hurones, varia especies de roedores y grandes felinos como son los tigres, leones, leopardos, guepardos y lince (24,26,42).

Los primates aparte de ser huéspedes accidentales de *M. bovis* tienden a ser más susceptibles a infectarse con *M. tuberculosis*. En animales de zoológicos y vida silvestre se ha logrado aislar ambas cepas a partir de monos Rhesus, monos de cola corta, bobones, babuinos, orangutanes y monos araña (30,37). Lo preocupante de esta situación es que en la mayoría de los casos la presencia de *M. tuberculosis* es mayor que la de *M. bovis* siendo esta una importante vía de infección entre animales y humanos que debería ser estudiada más a fondo, ya que en muchos países la interacción entre el ser humano y estos animales es muy común, además el consumo de carne de primate en algunos países del mundo y esta práctica puede ser un gran factor de riesgo para contraer tuberculosis ocasionada por *M. bovis* o *M. tuberculosis*.

Los reservorios de esta bacteria en vida silvestre dificultan el control o erradicación de *M. bovis* en muchas regiones del mundo, es practicante imposible su eliminación en diversas regiones geográficas debido a la gran cantidad de animales silvestres que mantiene y transmiten la bacteria entre sus poblaciones y hacia otras poblaciones (26,28,42).

### ***1.1.3.6 Medio ambiente.***

El ganado bovino productor de leche ha demostrado ser más propenso a infectarse con *M. bovis* que el ganado productor de carne, esto debido probablemente al sistema de producción intensivo en el cual las vacas están sometidas a un mayor estrés fisiológico al producir grandes cantidades de leche por día, lo cual exige grandes requerimientos nutrimentales y metabólicos que en combinación con los factores ambientales como cambios extremos de temperatura y humedad en los establos y condiciones de estrés fisiológico ocasionado por el manejo reproductivo, clínico y productivo (ordeño) generan las condiciones ideales para hacer más susceptible al ganado productor de leche a desarrollar enfermedades infecciosas. En contraparte el ganado productor de carne que se encuentra en un ambiente más tranquilo en los sistemas semi-extensivos y extensivo donde las exigencias metabólicas no son tan demandantes como en las producciones intensivas de leche y requiere menor manejo productivo lo cual genera menores situaciones de estrés fisiológico que puedan afectar el estado de salud de los animales en engorda.

### ***1.1.3.7 Transmisión.***

#### **1.1.3.7.1 Vías de eliminación.**

Las medios de diseminación más importantes son la leche y las secreciones respiratorias de animales infectados con *M. bovis*; sin embargo, la diseminación también puede ocurrir a través de materia fecal, orina, semen y descargas uterinas (26,42).

#### **1.1.3.7.2 Vehículos.**

Debido a la característica hidrofóbica de la pared de las micobacterias la leche es un vehículo ideal que permite la migración bacteriana por medio de la emulsión con las grasas presentes en la leche. Un número considerable de bacilos pueden ser excretados por una vaca con mastitis tuberculosa siendo este un foco de infección para otros animales incluyendo el hombre y la contaminación de una gran cantidad de litros de leche en los tanques de almacenamiento y transporte (30). Productos lácteos como el queso y el yogurt fabricados con leche contaminada pueden contener bacilos tuberculosos hasta 14 días después de su preparación y en la mantequilla hasta 100 días posteriores a la fabricación (30). Investigaciones en granjas del norte de India revelaron que hasta 28.5 % de muestras de leche eran positivas a cultivo de *M. tuberculosis* y alrededor de 15% eran positivas a *M. bovis*, además un 7.1 % de los hisopados faríngeos de estos animales fueron positivos a *M. tuberculosis* (43). En un estudio realizado en México en 57 hatos lecheros de 7 municipios del estado de México, se analizaron 722 muestras de leche y 13 esputos de trabajadores mediante la tinción de Ziehl-Neelsen, se encontraron 25 muestras positivas de leche (3.5%) distribuidas en 10 hatos de 7 municipios y 4 esputos (30.8%) pertenecientes a 2 hatos de 2 municipios (Zacazonapan y Temascaltepec) (32). Los estudios anteriores demuestran la importancia de la leche como vehículo de transmisión para las micobacterias y el riesgo que implica el consumo de leche sin hervir o pasteurizar.

### 1.1.3.7.3 Vías de infección.

La principal vía de infección en el ganado bovino es la respiratoria, alrededor de un 75-90% de la transmisión entre animales se da por esta vía mediante microgotas en forma de aerosoles que son expulsadas por los animales infectados al toser o respirar (27,30). La relevancia de esta vía de infección se debe a la baja dosis de micobacterias necesaria para establecer una infección efectiva en el tejido pulmonar de los bovinos (28). En algunos estudios se reporta la dosis mínima infectiva vía intratraqueal de 1-100 UFC (44-46). Otra vía de infección relevante es la vía digestiva la cual es particularmente importante en terneros lactantes y seres humanos que pueden infectarse al ingerir leche contaminada con *M. bovis* (26,27). No todos los animales infectados o positivos a la prueba de tuberculina son capaces de diseminar la bacteria hacia el medio ambiente, esto dependerá de la fase de infección en la que se encuentren y el estado inmunológico de cada animal. Sin embargo, aquellos cuadros respiratorios o de mastitis tuberculosa son los que representan un mayor riesgo de infección hacia otros animales (28). El riesgo de infección aumenta si los animales del hato se encuentran en confinamiento estrecho o comparten comederos y bebederos con animales infectados o excretores (26,42). En dos estudios realizados para evaluar la transmisión de la infección en el ganado bovino se determinó una morbilidad del 0-40 % , de los cuales del 0-10 % desarrollaron lesiones pulmonares considerables (26). La gravedad de la enfermedad dependerá en gran medida de la dosis infectante y de la condición inmunológica, fisiológica y nutricional de cada animal (26). Así como también de los factores ambientales y de manejo que existan en cada hato. Las vías de transmisión cutáneas y genitales son de menor relevancia (27). Así mismo la transmisión congénita es muy rara, ocurre en aproximadamente en el 1% de los becerros nacidos de madres infectadas (42).

### ***1.1.3.8 Patogénia.***

La infección con *M. bovis* inicia con el ingreso de las bacterias al organismo generalmente por vía respiratoria, la bacteria avanza hasta el espacio alveolar y ahí es donde los macrófagos alveolares y células epiteliales bronquiales y alveolares son las principales células encargadas de controlar la diseminación de las micobacterias en el parénquima pulmonar y hacia otros órganos por medio de la fagocitosis (47,48). Una vez dentro del macrófago las bacterias quedan internalizadas dentro del fagosoma y en la mayoría de los casos el sistema inmune es capaz de controlar la infección activando los mecanismos correspondientes para la fusión fagolisosomal, de esta manera se activan las enzimas hidrolíticas presentes en los lisosomas las cuales se encargaran de degradar y destruir a las bacterias y antígenos presentes en su interior (47–49). Sin embargo, *M. bovis* y otras micobacterias patógenas cuentan con mecanismos complejos de defensa que les permiten inhibir la acidificación del fagosoma bloqueando de esta manera la maduración y activación del fagolisosoma. Lo anterior genera un nicho intracelular para la bacteria que le protege de la respuesta inmunológica humoral y permite su replicación y sobrevivencia dentro de los macrófagos (48,49).

Los linfocitos Th1 por medio de la producción de interferón gama (INF- $\gamma$ ) activan a los macrófagos aumentando de esta manera su actividad fagocítica y estimula la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) encargada de la producción de óxido nítrico (NO) molécula muy importante en la actividad microbicida de los macrófagos (50,51). El INF $\gamma$  es esencial para el control de la infección, es producido principalmente por los linfocitos Th1, células natural killer (NK), y linfocitos CD8+ y junto con la interleucina 12 (IL-12) ayudan a la diferenciación de células CD4+ hacia la subpoblación de linfocitos Th1 (50,52,53). La respuesta inmunológica del huésped permite en muchos casos controlar a la bacteria, pero no eliminarla completamente, por lo que se requiere la formación de los

granulomas para poder contener la diseminación de la bacteria en el organismo. El primer paso para la formación del granuloma es el reclutamiento de células inmunes a la proximidad del foco de infección mediante la liberación de las citocinas del perfil Th1 (49). Las células Th1 juegan un papel importante para la formación de los granulomas mediante la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-12, IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF que favorecen el control de la infección mediante la activación de macrófagos y el reclutamiento de más células al sitio de infección como son las células NK, células T CD4+, CD8+ y células T  $\gamma\delta$  (48,49). Los granulomas están constituidos por un gran cúmulo de distintas células, las bacterias y los macrófagos infectados en fase de apoptosis se encuentran ubicados en la parte central del granuloma, hacia la parte media del granuloma se ubican los macrófagos epitelioides, las células gigantes, los neutrófilos y las células dendríticas todas ellas organizada en forma concéntrica. En la zona periférica del granuloma se encuentra una mayor concentración de células T, células B y células NK que a su vez están rodeadas por fibroblastos y fibras de colágeno que sirven para delimitar y estabilizar los granulomas (49,54,55). El factor de necrosis tumoral (TNF) es necesario para la formación y mantenimiento de los granulomas y una baja en su producción puede dar origen a la desorganización y disfunción de los granulomas, lo que conlleva a una reactivación de la enfermedad. Sin embargo, esta citocina en grandes cantidades puede generar inflamación destructiva en tejidos, fiebre, pérdida de peso, debilidad muscular y necrosis en los pulmones (49). A pesar de la formación adecuada de los granulomas en la mayoría de los casos es posible encontrar micobacterias viables dentro de estos durante largos periodos de tiempo esta etapa de la enfermedad es conocida como fase de latencia la cual puede durar meses o años hasta que se presentan algún factor desencadenante que reactivan la enfermedad (56).

### ***1.1.3.9 Signos clínicos.***

Los signos clínicos de la tuberculosis bovina pueden aparecer meses o años después de la infección inicial, los primeros signos suelen ser inespecíficos como disminución de la producción láctea, deterioro del estado general de salud, emaciación progresiva, fiebre baja fluctuante, debilidad, falta de apetito y cuando la vía de infección es digestiva se puede observar diarrea intermitente y estreñimiento (26,27).

En la fase intermedia de la enfermedad los pulmones se encuentran más comprometidos y generalmente los animales presenta una tos húmeda dolorosa que puede agravarse con los cambios de temperatura por las mañanas o noches. La pérdida de peso y apetito, así como la debilidad muscular son más evidentes con el progreso de la enfermedad y cuando los animales realizan algún esfuerzo físico puede observarse cuadros de disnea y taquipnea en los animales afectados (24,26,27).

En la fase terminal de la enfermedad, los animales se observan sumamente emaciados, caquéxicos y en algunos casos los ganglios linfáticos retrofaríngeos u otros ganglios de la región de la cabeza y tórax pueden presentar una gran inflamación y supuración, además pueden presentarse casos de hemoptisis y finalmente la muerte de los animales (24,26,27).

### ***1.1.3.10 Cambios morfológicos.***

En el ganado bovino las pequeñas lesiones granulomatosas se pueden hallar con mayor frecuencia en los ganglios linfáticos asociados con el sistema respiratorio y particularmente los ubicados en la zona de la cabeza y el tórax, como por ejemplo los ganglios linfáticos bronquiales, preescapulares, retrofaríngeos, mediastínicos y en órganos como pulmones, hígado y bazo (24,26,28).

Los granulomas presentan una coloración blanco-amarillenta y consistencia pastosa, pueden presentar un centro necrótico caseoso y dependiendo de la evolución o desarrollo los granulomas pueden mineralizarse y calcificarse generando lesiones visibles y permanentes que ocasionan una disfunción del tejido afectado, generalmente después de la calcificación o mineralización se pueden considerar la infección en fase de control (24,26,48).

### ***1.1.3.11 Tratamiento.***

Los animales infectados no son tratados debido al peligro de contagio que estos representan para los otros animales del hato. Además, la baja eficiencia de los antibióticos actuales en el área veterinaria, así como el elevado costo y el largo periodo de administración hacen imposible la implementación de un tratamiento efectivo en los animales infectados. Por lo tanto, es recomendable la matanza de los animales infectados en rastros autorizados por la SAGARPA para ayudar al control de la enfermedad a nivel nacional.

Por otra parte, el tratamiento en humanos infectados con *M. bovis* es el mismo empleado para tratar a *M. tuberculosis* a excepción de la utilización de pirazinamida a la cual *M. bovis* es resistente. El tratamiento en la primera fase (intensiva) consiste en la utilización de 3 fármacos de primera línea durante 2 meses como es la isoniazida (INH), rifampicina (RIF) y etambutol (ETB) y durante la segunda fase se medica con INH y RIF durante 4 meses, en niños se sustituye el ETB por estreptomina (57,58).

### ***1.1.3.12 Prevención y control.***

Las principales medidas preventivas que se pueden tomar para controlar esta enfermedad en el ganado bovino son:

- Realizar pruebas de tuberculina periódicamente en el ganado de nuevo ingreso para detectar a los animales reactivos y separar del hato de manera oportuna.
- Realizar cuarentenas a los animales de nuevo ingreso al hato y realizar las pruebas diagnósticas correspondientes para evitar el ingreso de algún animal infectado al establo.
- Tener medidas de bioseguridad adecuadas en la granja para evitar la entrada y salida de agentes patógenos por medio de automóviles y el personal de trabajo de la granja.
- Revisiones médicas periódicas en los animales para identificar oportunamente a los animales enfermos o susceptibles.
- Evitar el ingreso de animales domésticos o silvestres a la granja que puedan ser portadores y diseminadores de *M. bovis*.
- Realizar exámenes post mortem en los animales que hayan muerto en el establo para determinar la causa de la muerte y/o detectar lesiones indicativas de tuberculosis.
- Realizar la pasteurización de la leche para disminuir el riesgo de infección con *M. bovis* y evitar la elaboración de productos derivados lácteos a partir de leche sospechosa.

Actualmente en México no se vacuna el ganado bovino en contra de la tuberculosis bovina debido a que la vacunación presentan una eficiencia variable y su aplicación interfiere con la lectura en las pruebas de tuberculosis.

### ***1.1.3.13 Diagnóstico.***

Las pruebas diagnósticas autorizadas en la NOM-031-ZOO-1995 para la campaña nacional contra la tuberculosis bovina son:

1. Prueba de tuberculina.
2. Histopatología.
3. Aislamiento bacteriológico.
4. Otras pruebas complementarias que se consideren necesarias de acuerdo con las disposiciones de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.

#### **1.1.3.13.1 Prueba de la tuberculina.**

La prueba de tuberculina es el método estándar para diagnosticar la tuberculosis bovina es una prueba sencilla que comprende la inoculación intradérmica del derivado proteico purificado (PPD) bovino y/o aviar, 72 horas posteriores a la inoculación se realiza la medición comparativa del grosor de la reacción o inflamación dérmica (hipersensibilidad tipo IV o retardada) con ayuda de un cutímetro. Dependiendo de los valores obtenidos se determinará los bovinos reactivos/positivos y los negativos de acuerdo con las especificaciones descritas en la norma oficial (24,25,27).

Existen tres variantes de la prueba de tuberculina a utilizar en el diagnóstico de tuberculosis bovina y son utilizadas de acuerdo con las circunstancias planteadas en la norma oficial.

- a) Prueba en el pliegue caudal.
- b) Prueba cervical simple.
- c) Prueba cervical comparada.

Las tuberculinas utilizadas para realizar las pruebas diagnósticas son:

- a) **PPD bovino:** Es elaborado con la cepa AN5 de *Mycobacterium bovis* y es utilizada en los tres tipos de pruebas (caudal, cervical comparada y cervical simple).
- b) **PPD aviar:** Es elaborado con la cepa D4 de *Mycobacterium avium* y es utilizada en las pruebas caudal y cervical comparada, esta tuberculina debe contener como colorante el rojo de Ponceau para distinguirla de la de PPD bovino que no lleva colorante.

Por indicación de la norma, las tuberculinas deben ser transportadas y conservadas a temperatura de 4-8 °C y protegidas de la luz directa, además la aplicación se realiza de forma única y durante las 72 horas posteriores a la inoculación no se deberá efectuar ningún tipo de manejo como puede ser el herrado, desparasitación, vacunación o medicación para evitar alteraciones en los resultados (25).

La norma indica que todos los animales que son reactivos a la prueba de tuberculina deben ser marcados con una perforación circular en la parte central de la oreja izquierda de 2.5 cm de diámetro o con la letra "T" de forma permanente en el masetero Izquierdo, además deben ser colocado el arete rojo y ser enviados directamente a rastros autorizados por la secretaria para ser sacrificados (25).

### **1.1.3.13.2 Diagnóstico histopatológico.**

Las muestras destinadas para histología deben tener un tamaño no mayor a 2 cm por lado y deben ser fijadas en formol amortiguado al 10%, manteniendo una proporción 1:9 (Tejido:Formol).

Una vez procesadas las muestras histológicas en bloques de parafina y realizados los cortes correspondientes para ser montados en las laminillas, se realizará la tinción de hematoxilina-eosina para identificar la presencia de granulomas característicos de la enfermedad. Además, se puede realizar la tinción de Ziehl-Neelsen en los cortes o improntas para detectar *in situ* la presencia de bacilos ácido alcohol resistente.

### **1.1.3.13.3 Diagnóstico bacteriológico.**

El tamaño de las muestras de envío requeridas para el diagnóstico bacteriano deben tener una dimensión no mayor a 2 cm por lado y se procurará enviar áreas del tejido que contengan aparentes lesiones granulomatosas, en caso de remitir nódulos linfáticos se deberán enviar completos y sin grasa. En caso de no poder mantener refrigeradas las muestras o de requerir un par de días para ser procesadas las muestras tendrán que ser sumergidas en solución saturada de borato de sodio a una concentración final de 0,5% [p/v], el tiempo máximo que podrán permanecer los tejidos en esta solución es de 10 semanas.

El examen directo se realizará mediante la tinción de Ziehl-Neelsen realizando el frotis a partir del material sospechoso. En caso de emplear microscopia de fluorescencia se recomienda la tinción con auramina-rodamina, auramina-acridina o auramina-fenol.

El examen indirecto se realizará mediante cultivo, aislamiento e identificación de *M. bovis* a través de la siembra del material sospechoso en medios especiales crecimiento como en los medios Herrolds con y sin huevo, Middlebrook, Stonebrink, Petragnani, ATS y Lowenstein Jensen, estos medios deben ser complementados con piruvato de sodio. El crecimiento de la bacteria es lento por lo que se logran observar las colonias hasta las 3-6 semanas de incubación a 37°C con o sin CO<sub>2</sub>, las colonias de *M. bovis* presentan un aspecto liso y de color pardusco (24,25).

#### 1.1.3.13.4 Reconocimiento de ácidos nucleicos.

En los últimos años se han desarrollado un gran número de métodos de diagnósticos usando como base el ADN de las bacterias, dentro de las pruebas más utilizadas están:

- La tipificación con oligonucleótidos espaciadores mejor conocida como espoligotipificación permite la diferenciación entre las cepas pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* permitiendo la diferenciación entre cepas de *M. bovis* y *M. tuberculosis* (24,28).
- El análisis de los fragmentos de restricción de longitud polimorfa (RFLP) usando las sondas IS6110 y/o IS1081 (24,28,59).
- La prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) también es útil para el diagnóstico de *M. bovis* (24).

Estas pruebas moleculares permiten obtener resultados más rápidos que otras pruebas diagnósticas, sin embargo, presentan la desventaja del elevado costo y el requerimiento de aparatos más especializados para el procesamiento de las muestras.

#### 1.1.3.13.5 Prueba de interferón gama.

La prueba del interferón gama aún está en evaluación y serían de gran ayuda para detectar casos de tuberculosis en animales salvajes o en zoológicos donde es difícil manipular a los animales o cuando no se pueden obtener muestras constantemente para realizar las mediciones. La prueba se basa en la liberación de IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos sensibilizados durante un período de incubación de 16-24 horas con el antígeno específico (tuberculina PPD). La cuantificación se realiza mediante un ELISA "sandwich" donde se utilizan dos anticuerpos monoclonales contra el gamma interferón bovino y se recomienda transportar las muestras de sangre al laboratorio y realizar el ensayo en un periodo no mayor a 24-30 horas posteriores a la toma de la muestra (24,26).

### **1.1.3.13.6 Toma y envío de muestras.**

Las muestras tisulares recomendadas por la norma para realizar el diagnóstico histopatológico y bacteriológico son aquellas que presentan lesiones granulomatosas visibles características de la tuberculosis o secreciones sospechosas. Las principales muestras de tejidos a remitir son:

- Ganglios linfáticos preescapulares, mediastínicos anteriores y posteriores, bronquial derecho e izquierdo y en el caso de tuberculosis miliar nódulos mesentéricos.
- Pulmones con lesiones granulomatosas caseosas o calcificadas.
- Útero y su exudado en caso de sospechar de metritis tuberculosa.
- Otros órganos: bazo, hígado, riñón, médula ósea, ovarios, testículos y glándula mamaria en caso de observar lesiones sugestivas a tuberculosis.

Todas las muestras enviadas para diagnóstico deberán ir identificadas adecuadamente con la siguiente información: nombre del propietario, ubicación de la explotación de origen, dónde se obtuvo la muestra, órgano remitido, descripción del animal (especie, raza, sexo y edad), identificación precisa del animal (arete, marca, u otro); nombre, registro y domicilio del médico veterinario oficial o aprobado que remite la muestra, destino del canal y vísceras especificando si se trata de un decomiso parcial o total (25).

## 1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

*Mycobacterium bovis* sigue siendo una bacteria que genera un importante número de muertes humanas alrededor del mundo y una gran pérdida económica en los establos lecheros (28,56,60). Representa un factor de riesgo para la salud pública debido al tipo de comercialización y procesamiento de los productos lácteos realizado en diversas regiones del país y el mundo (48).

Por otra parte el tratamiento actual con antibióticos en seres humanos es largo y ocasiona en la mayoría de los casos alteraciones gastrointestinales, daño hepático y otras alteraciones que imposibilitan la culminación del tratamiento promoviendo la aparición de cepas multidrogoresistentes (MDR) y extremadamente resistentes (XDR) (63,64,58), mientras que en el ganado bovino prácticamente no existe algún tratamiento eficaz que pueda ser implementado, debido a que es incosteable y poco recomendado debido al largo periodo de administración, baja efectividad y eliminación de antibiótico a través de la leche que imposibilita la comercialización aumentando las pérdidas económica en los establos lecheros por el desecho de animales positivos a la pruebas de tuberculosis y miles de litros de leche contaminada.

Los compuestos químicos obtenidos a partir de los extractos de plantas medicinales han demostrado tener propiedades terapéuticas benéficas para el tratamiento de la tuberculosis, actuando ya sea de manera directa sobre la micobacteria o mediante la estimulación de las células del sistema inmune (5–10,65,66). La preparación etanólica elaborada con los frutos del crucetillo (*R. aculeata*) ha demostrado tener algunas propiedades terapéuticas actuando como analgésico y como inmunomodulador ayudando en el tejido muscular, sin embargo muchas otras propiedades terapéuticas de esta planta no han sido estudiadas (12–14).

Las plantas del mismo género (*Randia*) que han sido estudiadas en otros países, han demostrado algunas propiedades antimicrobianas, inmunoestimulantes y antioxidantes (16,18,19,21,22).

A partir de la información recopilada surgió el interés de evaluar otras propiedades terapéuticas distintas a las ya estudiadas, por lo que el interés de la presente investigación es obtener extractos crudos a partir de los frutos del Crucetillo (*R. aculeata*) para evaluar las posibles propiedades antimicrobianas sobre *M. bovis* cepa de AN5 y determinar si los extractos presentan alguna actividad inmunoestimulante que ayude a los macrófagos a controlar el crecimiento intracelular de las micobacterias.

### 1.3 JUSTIFICACIÓN

Los frutos de Crucetillo (*R. aculeata*) son vendidos y utilizados por muchas personas en diversas regiones del país con el fin de curar y aliviar diversas enfermedades, sin embargo, existe escasa evidencia científica que avale su efectividad y seguridad de uso, por lo que es necesario realizar estudios científicos que ayuden a conocer sus verdaderas propiedades terapéuticas y sus mecanismos de acción. En caso de que los extractos obtenidos a partir de los frutos del crucetillo (*R. aculeata*) demuestren tener propiedades antimicrobianas o inmunomoduladoras se podría aislar e identificar nuevos compuestos químicos que ofrezcan una nueva alternativa para el tratamiento de la tuberculosis en animales y seres humanos. Además, se podría buscar la complementación del tratamiento actual con los extractos buscando reducir; el periodo de administración, la dosis aplicada y los efectos secundarios que ocasiona la administración de algunos antibióticos durante largos periodos de tiempo principalmente el daño hepático y alteraciones gastrointestinales.

## 1.4 OBJETIVOS DEL TRABAJO

### Objetivo General

- Obtener extractos crudos a partir del fruto del crucetillo (*R. aculeata*) con dos diferentes solventes y evaluar sus actividad antimicrobiana en *Mycobacterium bovis* cepa AN5 y su actividad inmunomoduladora en macrófagos murinos J774A.1 infectados.

### Objetivos Específicos

- Obtener extractos crudos a partir del fruto del crucetillo (*R. aculeata*) con dos solventes (Etanol y Metanol) mediante la técnica de maceración en frío.
- Comparar los extractos con compuestos químicos comerciales mediante la técnica de cromatografía de capa fina para conocer la composición química general.
- Cuantificar la cantidad de fenoles totales en los extractos mediante el método de Folin-Ciocalteu para conocer su composición química y potencial antioxidante.
- Evaluar cada extracto a diferentes concentraciones sobre la cepa AN5 de *M. bovis*, mediante el método de azul de alamar para determinar su potencial como antimicrobiano.
- Evaluar los extractos a diferentes concentraciones en macrófagos J774. A.1 mediante el método de azul de tripano y resarzurina para evaluar su citotoxicidad.
- Determinar el número de unidades formadoras de colonia (UFC's) obtenidas a partir del ensayo de killing para evaluar el efecto inmunomodulador de los extractos sobre la capacidad de los macrófagos para controlar el crecimiento intracelular de la micobacteria.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 2.1 PROCEDIMIENTOS BOTÁNICOS

### 2.1.1 Material vegetal.

La planta *R. aculeata* y sus frutos fueron colectados en el mes de Junio del año 2017 en la localidad de Paraíso la Reforma situada en el municipio de Tezonapa, estado de Veracruz, ubicada a una altitud de 300 metros sobre el nivel del mar, su clima es considerado cálido húmedo con una temperatura media anual de 22°C y presencia de lluvias en verano. Un espécimen de la planta y frutos fueron enviados al Herbario del IMSS ubicado en el Centro Médico Nacional Siglo XXI para su identificación.

## 2.2 PROCEDIMIENTOS QUÍMICOS

### 2.2.1 Obtención de extractos.

Los frutos del crucetillo (*R. aculeata*) fueron secados durante varios días a la sombra, una vez secos fueron triturados con ayuda de un molino manual y el material obtenido fue pesado para posteriormente separarlo en 3 partes de 92 gramos en promedio los cuales fueron utilizados para realizar la extracción de los compuestos por la técnica de maceración con 400 mL del respectivo disolvente (Metanol o Etanol) a temperatura ambiente durante 7 días, 3 veces. Cada extracto obtenido fue filtrado con papel filtro Whatman grado 1 y posteriormente se concentró en un rotavapor a presión reducida (temperatura  $\leq 40^{\circ}\text{C}$ ). Los extractos obtenidos se colocaron en frascos de vidrio para terminar de evaporar el disolvente restante en una campana de flujo durante 3 días. Se registró el peso final de cada extracto y se calculó el porcentaje de rendimiento final. Posteriormente los extractos fueron transferidos a tubos eppendorf de 1.5 mL colocando aproximadamente 1 gramo de extracto en cada tubo los

cuales fueron cubiertos con papel aluminio para protegerlos de la exposición directa de la luz y fueron almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su empleo. Finalmente, de acuerdo con el requerimiento se realizaron alícuotas (stock) de cada extracto a una concentración final de 20 mg/ml en Dimetilsulfóxido (DMSO) las cuales fueron también protegidas de la luz directa y almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Para realizar los ensayos químicos los extractos se utilizaron de manera pura y para los ensayos microbiológicos y celulares se utilizaron disueltos en DMSO.

### **2.2.2 Cromatografía de capa fina (CCF).**

El análisis fitoquímico permite conocer de manera general la composición química de los extractos obtenidos a partir de plantas medicinales. La cromatografía de capa fina (CCF) es una técnica de rutina muy rápida y sencilla que permite identificar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios de las plantas en los extractos como por ejemplo los alcaloides, flavonoides, taninos, terpenos, terpenoides, saponinas, líganos, cumarinas, ácidos esenciales, antraquinonas, iridoides entre otros que son de importancia médica y/o farmacológica.

El siguiente procedimiento fue realizado en el laboratorio de la unidad de investigación médica en farmacología de productos naturales del hospital de pediatría del centro médico nacional siglo XXI del IMSS. Para realizar los cromatogramas fueron empleadas placas cromatográficas de Silica gel 60F254 (Merck) de diferentes tamaño. Con ayuda de un capilar se colocaron los extractos (MeOH o EtOH) sobre la placa hasta formar una mancha o punto de aproximadamente 5 mm de diámetro, de la misma manera fueron colocados los compuestos químicos de referencia en la placa (flavonoides, polifenoles, terpenos). Los diversos sistemas de elución fueron preparados en un volumen de 5 mL, dichos sistemas

fueron determinados de acuerdo con las necesidades y características de los compuestos químicos a identificar en el cromatograma. Una vez vaciado el sistema móvil en la cámara de elución esta fue tapada con un cristal para promover su saturación. Posteriormente la placa fue introducida en la cámara de elución a temperatura ambiente y la cámara se mantuvo tapada hasta que la fase móvil llegó a la línea trazada en la parte superior, momento en el cual fue extraída con ayuda de unas pinzas. Después de finalizar el proceso de elución, las placas se dejaron secar al aire libre y posteriormente fueron visualizadas con ayuda de una lámpara de luz UV a una longitud de onda 254 y 365 nm para marcar con un lápiz los compuestos que se hicieran visibles. Posteriormente, las placas fueron reveladas con la aplicación en forma de spray de un agente revelador específico (NP/ PEG o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%) de acuerdo a la naturaleza química de los compuestos a detectar. Las placas fueron secadas al aire libre y posteriormente fueron calentadas en una parrilla eléctrica, finalmente fueron visualizadas nuevamente en UV a 254 y 356nm y se marcaron los nuevos compuestos visibles.

### **2.2.3 Cuantificación de fenoles totales en los extractos.**

Los compuestos fenólicos se caracterizan por poseer una importante actividad antioxidante y diversas propiedades de interés farmacológico y terapéutico de ahí surge la importancia de buscar y cuantificar la presencia de estos compuestos químicos en los extractos obtenidos a partir de los frutos de *R. aculeata*.

Para determinar la cantidad de fenoles totales presentes en los extractos (MeOH y EtOH) se utilizó el método de Folin-Ciocalteu. El día del análisis se preparó una solución stock de 2.5 mg de ácido gálico/ml (estándar) en ácido acético/acetonitrilo al 4%, a partir de este stock se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 0.125, 0.25, 0.5, 1, 1.5 y 2 mg de ácido

gálico /ml que serían empleadas para realizar la curva de calibración. Por otra parte, se prepararon diferentes diluciones de cada extracto (MeOH o EtOH) en ácido acético/acetonitrilo al 4% para obtener concentraciones de 10, 15 y 20 mg de extracto /ml. Una vez lista las diluciones se procedió a realizar el ensayo, agregando en tubos de vidrio 2.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1:10 en H<sub>2</sub>O) seguido de 0.5 mL de la muestra a evaluar (extracto MeOH o EtOH o ácido gálico o agua destilada como blanco) se agitaron vigorosamente los tubos y se dejaron reposar durante 3-5 min a temperatura ambiente, posteriormente se agregó 2 mL de solución de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) al 7.5% en cada tubo y se colocaron en un baño de agua a 45°C durante 15 minutos. Finalmente se realizó la lectura de la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro (Bio-Rad: Smart Spec) a una longitud de onda de 765 nm y se registraron los valores obtenidos para su posterior análisis. La concentración total de fenoles presentes en los extractos se calculó con base en la ecuación obtenida de la curva de calibración de ácido gálico ( $y = 0.0024x + 0.0227$ ,  $R^2 = 0.9886$ ) la cual fue despejada y se obtuvo la ecuación 1 que fue empleada para realizar los cálculos finales y reportar los resultados en  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico por mL ( $\mu\text{g}$  EAG/mL).

$$\text{Ecuación 1} \quad X = \frac{(y - 0.0227)}{0.0024}$$

**X** = Concentración total de fenoles expresado en microgramos equivalentes de ácido gálico por mililitro ( $\mu\text{g}$  EAG/mL).

**y** = Absorbancia obtenida de la muestra a 765 nm.

## 2.3 PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS Y CELULARES

### 2.3.1 Cultivo de la cepa AN5 de *Mycobacterium bovis*.

La cepa AN5 de *M. bovis* fue cultivada a 37°C en medio de cultivo Middlebrook 7H9 complementado con piruvato sódico al 0.4%, Tween 80 al 0.05% y enriquecido con OADC al 10% (ácido oleico, albumina, dextrosa y catalasa). Las bacterias fueron crecidas hasta alcanzar su fase logarítmica (Densidad óptica de 0.6-0.7, lectura a longitud de onda de 600 nm) para realizar cada experimento.

### 2.3.2 Determinación de la actividad antimicobacteriana de los extractos mediante el método de MABA (Microplate Alamar Blue Assay).

Se determinó la posible actividad antimicrobiana de los extractos MeOH y EtOH obtenidos de los frutos de *R. aculeata* usando el método colorimétrico MABA modificado (67). En una placa de 96 pozos de fondo plano se colocaron 200 µL de agua estéril en los pozos de la periferia y no utilizados. En todos los pozos destinados a evaluar los extractos se colocó 100 µL de medio 7H9-Complementado. En la primera columna de pozos destinados a evaluar los extractos se agregó 100 µL de una solución con medio 7H9-Complementado que contenía los extractos (MeOH o EtOH) a concentración 4X (1,600 µg/mL). Posteriormente realizaron diluciones dobles seriadas transfiriendo 100 µL de columna en columna hasta la columna 8 y se eliminó los 100 µL restantes. Seguido a lo anterior se agregó 100 µL de una suspensión bacteriana de la cepa AN5 de *M. bovis* (previamente ajustada al tubo No.1 de McFarland y diluida 1:20 en medio 7H9-Complementado) para obtener concentraciones finales de 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 µg de extracto/ml. Se realizaron los controles positivos de crecimiento bacteriano al 1%, 10% y 100%, utilizando una proporción de 2:198, 10:190 y 100:100 µL de la suspensión bacteriana ajusta: Medio 7H9-complementado respectivamente (*Figura 1*). La placa se incubó durante 6 días a 37°C y posteriormente se agregó 20 µL de

una solución de resazurina al 0.015% en todos los pozos y se incubó durante 24 horas a 37°C. pasado el tiempo de incubación si los controles del crecimiento bacteriano al 100% viraron de color azul a rosa y el control de crecimiento de 1% se mantuvo en color azul, se determinó visualmente la concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada extracto. La CMI fue definida como la concentración más baja del extracto capaz de prevenir el viraje de color en los pozos, siendo en este caso el control de crecimiento bacteriano al 1% el punto de referencia. Por último, para confirmar los resultados observados se midió la fluorescencia de la placa en un fluorómetro (Fluoroskan Ascent Thermo Scientific) a una longitud de onda de excitación de 544 nm y de emisión de 590 nm. Los datos obtenidos fueron registrados para su posterior análisis.

### **2.3.3 Cultivo y preparación de macrófagos J774A.1 para la realización de experimentos.**

Los macrófagos de ratón de la línea celular J774A.1 fueron crecidos en medio F12 complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y penicilina-gentamicina a concentración de 100 UI/mL y 50 µg/mL respectivamente. Las células fueron incubadas 37°C en atmosfera al 5%. de CO<sub>2</sub>. Los macrófagos fueron cosechados cuando alcanzaron un 80% de confluencia, entonces fueron despegados con ayuda de una asa microbiológica y la suspensión celular fue centrifugada a 1,500 rpm por 10 min, el sobrenadante se desechó y el pellet de células se resuspendió en 2 mL de medio F12. Posteriormente se realizó una dilución 1:10 tomando 10 µL de la suspensión celular y 90 µL azul de tripano al 0.2% una vez hecha la dilución se tomaron 10 µL y se colocó en la cámara de Neubauer para realizar el conteo de células viables con ayuda de un microscopio (Carl Zeiss Axiostar plus). Por último, se realizaron los cálculos para ajustar la cantidad de células viables necesarias para cada experimento a desarrollar.

### 2.3.4 Ensayo de citotoxicidad mediante el método de azul de tripano.

Para determinar la posible citotoxicidad de los extractos obtenidos de los frutos de *R. aculeata* se utilizó el método de azul de tripano para analizar la viabilidad celular de los macrófagos J774A.1 a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la exposición con los extractos (MeOH y EtOH) de *R. aculeata* a diferentes concentraciones (10, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ ).

En placas de 96 pozos de fondo plano se colocaron en todos los pozos 10,000 macrófagos suspendidos en 100  $\mu\text{L}$  de medio F12 al 3% de SFB y se dejaron adherir toda una noche. Al día siguiente se agregó un volumen de 100  $\mu\text{L}$  de medio F12 al 3% de SFB que contenía el extracto (MeOH o EtOH) a concentración de 200, 100, 50 y 20  $\mu\text{g/mL}$ , obteniendo de esta manera concentraciones finales de 100, 50, 25, 10  $\mu\text{g/mL}$  en los pozos de la placa. Para los pozos del grupo testigo se agregó 100  $\mu\text{L}$  de medio F12 al 3% de SFB y para el grupo testigo de DMSO 0.5% se agregó 99  $\mu\text{L}$  de medio F12 al 3% y 1  $\mu\text{L}$  de DMSO. Posteriormente la placa se incubó a 37°C en atmosfera al 5% de CO<sub>2</sub> hasta finalizar las mediciones de los diferentes tiempos analizados 24, 48 y 72 hrs. Pasando los tiempos de incubación (24, 48 o 72hrs) se adicionó 25  $\mu\text{L}$  de azul de tripano en cada pozo y con ayuda de un microscopio invertido (Carl Zeiss Axiovert 40 CFL) se procedió a realizar un conteo de 120 células en 4 campos al azar por pozo (objetivo 20X), determinando la cantidad de células viables y no viables (azules). Se registraron los datos obtenidos para su posterior análisis. Los resultados se reportaron en porcentaje considerando la viabilidad del grupo control como el 100% para cada tiempo.

### **2.3.5 Ensayo de citotoxicidad mediante el método de resarzurina.**

El método de reducción de la resarzurina es una técnica muy utilizada para monitorear de manera indirecta la viabilidad y proliferación celular mediante la cuantificación de la fluorescencia emitida por la resorufina, siendo un método fácil, barato y poco tóxico para las células.

En placas de 96 pozos de fondo plano se colocaron 10,000 macrófagos suspendidos en 100µL de medio F12 al 3% de SFB en todos los pozos y se dejaron adherir toda una noche a 37°C en atmosfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente se agregaron 100 µl de medio F12 al 3% de SFB que contenían los extractos (MeOH o EtOH) a concentraciones de 200,100,50 y 20 µg/mL, obteniéndose concentraciones finales de 100, 50, 25, 10 µg/mL en los pozos. Para los pozos del grupo control se agregó 100 µL de medio F12 al 3% de SFB y para el grupo control de DMSO 0.5% se agregó 99 µL de medio F12 al 3% y 1 µL de DMSO. Posteriormente la placa se incubo a 37°C en atmosfera al 5% de CO<sub>2</sub> hasta finalizar las mediciones de los diferentes tiempos analizados 24, 48 y 72 hrs. Una vez cumplido el tiempo de incubación (24, 48 o 72 hrs) se agregó 20 µL de resarzurina al 0.015% en cada pozo y se dejó incubado durante 4 horas a 37°C en atmosfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente se midió la fluorescencia de la placa con el fluorometro (Fluoroscank Ascent Thermo Scientific) a una longitud de onda de excitación de 544 nm y de emisión de 590 nm. Los datos obtenidos fueron registrados para su posterior análisis.

### 2.3.6 Ensayo de killing con *Mycobacterium bovis* cepa AN5 en macrófagos J774A.1.

➤ **Infección de macrófagos con la cepa AN5 de *Mycobacterium bovis*.**

En placas de 24 pozos de fondo plano se sembrarán 100,000 macrófagos por pozo suspendidos en 900  $\mu$ L de medio F12 al 3% de SFB y se dejaron adherir toda una la noche a 37°C en atmosfera al 5% CO<sub>2</sub>. Pasando el tiempo de adhesión se procedió a infectar los macrófagos con 100  $\mu$ l de una suspensión bacteriana de la cepa AN5 de *M. bovis* previamente ajustada al tubo No.1 de McFarland y diluida 1:20 en medio F12 al 3% de SFB. Se dejó fagocitar a los macrófagos durante 2 horas a 37°C y posteriormente se realizaron 3 lavados en cada pozo con 1 mL PBS para eliminar las bacterias no fagocitadas. Una vez realizados los lavados se agregaron 900  $\mu$ L de medio F12 al 3% de SFB en todos los pozos. En los pozos destinados a evaluar los extractos se agregó 100  $\mu$ L de medio F12 al 3% de SFB que contenía el extracto (MeOH o EtOH) a concentración de 100, 500 y 1,000  $\mu$ g/mL obteniendo de esta manera concentraciones finales de 10, 50 y 100  $\mu$ g/mL en los pozos. Para los pozos del grupo control se agregó 100  $\mu$ L de medio F12 al 3% de SFB y para el control de DMSO al 0.5% se colocaron 5 $\mu$ L de DMSO y 95 $\mu$ L de medio F12. Los macrófagos del grupo control al tiempo 1 (T<sub>2</sub>=2 hrs post infección) se lisaron después de realizar los tres lavados con PBS como más adelante se explicará. Para evaluar los grupos al tiempo 2 (96 horas post infección) se incubo la placa a 37°C en atmosfera al 5% CO<sub>2</sub> durante 96 hrs. Pasado el tiempo de incubación (2 o 96 horas), se procedió a realizar la lisis de los macrófagos de la siguiente manera, se retiró el medio que estuviera presente en los pozos y se agregó 500  $\mu$ L de SDS al 0.25% en cada pozo dejando actuar durante aproximadamente 2-3 minutos. Posteriormente se agregó 500  $\mu$ L de albumina sérica bovina al 4% en PBS, en cada pozo para neutralizar la reacción de lisis, finalmente se recuperó el lisado celular de los macrófagos en tubos eppendorf de 1.5 mL para su posterior siembra o almacenamiento a -70°C.

### ➤ **Determinación del número unidades formadoras de colonia (UFC's).**

En una placa de 96 pozos se realizaron diluciones decuples seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  colocando 270  $\mu\text{L}$  de PBS-Tween 80 al 0.05% en todos los pozos y con 30  $\mu\text{L}$  del lisado celular de macrófagos previamente sonicado durante 45 segundos. Una vez hechas las diluciones se sembró por triplicado 10  $\mu\text{L}$  de cada dilución en placas de medio 7H10-complementado, también se sembró por duplicado 10  $\mu\text{L}$  del concentrado (lisado celular de macrófagos). Todas las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta el día de la lectura. Al día 14 posterior a la siembra se realizó el primer conteo de unidades formadoras de colonia (UFC's) con ayuda de una lupa (Novex Holland 65.560 RZT-SF) y se realizó un recuento al día 21. Los datos fueron registrados para su posterior análisis.

## RESULTADOS

### 3.1 PROCEDIMIENTOS BOTÁNICOS

#### 3.1.1 Material vegetal.

Se recolectaron aproximadamente de 350 a 400 gramos de frutos maduros que se emplearon posteriormente para la obtención de los extractos. Las principales estructuras del árbol y los frutos fueron fotografiadas para ser documentadas gráficamente (*Imagen 1*).

### 3.2 PROCEDIMIENTOS QUÍMICOS

#### 3.2.1 Obtención de extractos a partir de los frutos de *Randia aculeata*.

Por medio de la técnica de maceración en frío se obtuvieron de manera sólida 16.38 g de extracto metanólico crudo (MeOH) y 6.46 g de extracto etanólico crudo (EtOH), obteniéndose un porcentaje de rendimiento del 17.8% y 7.0% respectivamente (Cuadro 1). Ambos extractos presentaron un color café oscuro y un olor dulce muy peculiar.

#### 3.2.2 Análisis fitoquímico.

Al realizar la comparación de los extractos (MeOH y EtOH) de *R. aculeata* con algunas referencias comerciales de flavonoides comunes como la narigenina, amentoflavona, caemferol y quercetina; en ambos extractos no se observó la presencia de estos flavonoides (*Imagen 2A*). De la misma forma al realizar de la comparación los extractos con otras referencias de compuestos polifenólicos como es el ácido cafeico, ácido clorogénico, rutina, ácido gálico y caemferol, tampoco se identificó la presencia de estas referencias en los extractos de *R. aculeata* (*Imagen 2B*). Otras referencias empleadas fueron la mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico (*Imagen 3 y 4*), esta mezcla probablemente se encuentra presente en ambos extractos como se observa en la *Imagen 4A y B*, en este caso se emplearon tres sistemas de elución y dos diferentes agentes reveladores.

### **3.2.3 Cuantificación de fenoles totales en los extractos mediante el método de Folin-Ciocalteu.**

El contenido total de fenoles presentes en los extractos MeOH y EtOH fue analizando a concentraciones de 1, 1.5 y 2.0 mg de extracto/ml. En la *Figura 2* se muestra la curva estándar de ácido gálico y su respectiva ecuación que fueron utilizadas para las interpretaciones de los valores de absorbancia obtenidos en las muestras analizadas. Los resultados obtenidos se muestran en la *Cuadro 2*, donde se observa la presencia de compuestos fenólicos en ambos extractos de *R. aculeata*, sin embargo, se detectó una mayor cantidad de fenoles totales en el extracto EtOH registrando un promedio de 68.7 mg EAG/g de extracto en comparación al extracto MeOH que reporto un promedio de 22.8 mg EAG/g de extracto.

## **3.3 PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS Y CELULARES**

### **3.3.1 Determinación de la actividad antimicobacteriana de los extractos de *Randia aculeata* mediante el método MABA (Microplate Alamar Blue Assay) modificado.**

Los resultados obtenidos mediante este método demostraron que los extractos (MeOH y EtOH) de *R. aculeata* no poseen algún efecto antimicobacteriano perceptible sobre la cepa AN5 de *M. bovis* a ninguna de las concentraciones evaluadas (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/mL}$ ), por lo que la CMI es  $> 400 \mu\text{g/mL}$ . En la *Figura 3* se observa la imagen de la placa con los resultados obtenidos mediante este método, donde se puede observar de forma indirecta el crecimiento de la bacteria en todos los pozos tratados con alguna concentración de los extractos y en el grupo control de crecimiento bacteriano al 100% al observarse en todos estos pozos el viraje de color azul a rosa indicando la presencia de una cantidad elevada de bacterias metabólicamente activas. Por otro lado, en los pozos controles de crecimiento bacteriano al 1% considerados como el punto de corte para determinar la concentración

mínima inhibitoria (CMI) en este método, se aprecia una coloración azul indicando que la cantidad de bacterias presentes en los pozos es mínima siendo incapaces de lograr el viraje de la coloración.

Para confirmar los resultados observados a simple vista, la placa fue leída para determinar la fluorescencia y detectar la cantidad de resorufina presente en los pozos (molécula producida por la reducción de la resazurina a través del metabolismo activo de las bacterias la cual emite fluorescencia al ser estimulada a una longitud de onda de 544 nm contrastando con la resazurina que no fluoresce). En la *Figura 4* se muestran el valor promedio de fluorescencia de cada grupo de pozos expresado en unidades relativas de fluorescencia (URF) y sus respectivas desviaciones estándar, obtenido de dos replicas con tres repeticiones.

Los datos fueron analizados estadísticamente con la prueba de ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett's. Los pozos del grupo control de crecimiento bacteriano al 1% presentaron los valores más bajos de fluorescencia de todos los grupos analizados. Por otro lado, todos los grupos tratados con alguna concentración de los extractos (MeOH o EtOH) presentaron valores de fluorescencia superiores al grupo control del 1% confirmando la ausencia de una concentración mínima inhibitoria por parte de los extractos de *R. aculeata* sobre la cepa AN5 de *M. bovis* en las concentraciones evaluadas. Todos los grupos evaluados fueron estadísticamente similares al grupo control de crecimiento bacteriano del 100% a excepción de los grupos con 400 µg de extracto/mL que presentaron valores de fluorescencia estadísticamente superiores al grupo control de crecimiento bacteriano al 100%.

### **3.3.2 Determinación de la citotoxicidad de los extractos mediante la técnica de azul de tripano.**

Los resultados obtenidos mediante el conteo de células viables y no viables con el método de azul de tripano, demostraron que los extractos (MeOH y EtOH) de *R. aculeata* no poseen efectos citotóxicos perceptibles con este método sobre los macrófagos J774A.1 en las concentraciones analizadas (10, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y a ninguno de los tiempos evaluados (24, 48 y 72 horas post exposición), ya que se observó en todos los grupos estudiados una viabilidad celular mayor al 75% considerada como punto de referencia para reportar citotoxicidad. En la *Figura 5* se muestran graficados los valores promedio de viabilidad celular de cada grupo estudiado expresado en porcentaje, considerando la viabilidad del grupo control como el 100%, los datos fueron obtenidos de dos replicas con tres repeticiones cada una. En ninguno de los grupos evaluados se observó un porcentaje relevante de células muertas que indicaran una posible actividad citotóxica por parte de los extractos sobre los macrófagos.

### **3.3.3 Determinación de la citotoxicidad de los extractos mediante el método de resarzurina.**

Los valores de fluorescencia (URF) obtenidos en las mediciones realizadas en los pozos de las placas fueron convertidos a porcentaje, tomando los valores del grupo control como referencia del 100% para cada tiempo, los datos fueron obtenidos de dos replicas con tres repeticiones cada una. En la *Figura 6* se muestran graficados los valores promedio de cada uno de los grupos evaluados. Los resultados obtenidos mediante este método demuestran que los extractos (MeOH y EtOH) del crucetillo no presentan una actividad citotóxica de importancia sobre los macrófagos J774A.1 a las concentraciones (10, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y en ninguno de los tiempos evaluados, siendo el porcentaje de viabilidad celular superior al 75% en todos los grupos analizados.

### 3.3.4 Ensayo de killing para evaluar el efecto inmunomodulador de los extractos.

Los resultados obtenidos a partir de este ensayo demostraron que los extractos (MeOH y EtOH) de *R. aculeata* en las diferentes concentraciones estudiadas (100, 50, 10  $\mu\text{g/mL}$ ) no disminuyen el crecimiento intracelular de *M. bovis* en los macrófagos J774A.1 y por el contrario promovieron la sobrevivencia y el crecimiento de la micobacteria intracelularmente. En la *Figura 7* se muestran graficados los valores promedios de las unidades formadoras de colonia (UFC/mL) obtenidos en los diferentes grupos estudiados a las 2 y 96 horas post infección. El estudio estadístico de los datos fue realizado mediante un ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

El grupo control a las 2 horas post infección (T2) presento el menor número de UFC's de todos los grupos estudiados, por su parte el grupo control después de 96 horas post infección (T96) mostró un aumento en el crecimiento intracelular de las micobacterias registrando un mayor número de UFC's con respecto al grupo T2 siendo estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ), por su parte el grupo control de DMSO al 5% no presento diferencia estadística con respecto al grupo T96 demostrando que la cantidad de DMSO utilizada como diluyente de los extractos no afecto los resultados observados en el experimento.

El extracto metanólico a las 3 concentraciones estudiadas 10, 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$  (M10, M50 y M100 respectivamente) promovió el crecimiento de la bacteria dentro de los macrófagos registrando valores de UFC's estadísticamente superiores al grupo control T96 ( $p < 0.05$ ); sin embargo, entre estas concentraciones no hubo diferencias estadísticas significativas. Por su parte el extracto etanólico a concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  (E10) presento un promedio ligeramente superior al grupo control T96; sin embargo, no fue estadísticamente diferente,

pero a concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$  (E50 y E100) se observó una mayor cantidad de UFC's en comparación al grupo control T96 siendo estadísticamente significativo para ambos casos ( $p < 0.05$ ), además se detectó una cierta tendencia dosis dependiente, donde a mayor concentración de extracto EtOH se podía observar una mayor cantidad de UFC's.

Ambos extractos favorecen el crecimiento intracelular de *M. bovis* en los macrófagos dando como resultado un aumento en la cantidad UFC's. También se observó que los extractos presentan un comportamiento biológico diferente entre ellos, estas diferencias probablemente tengan que ver con la composición química de los extractos ya que se observó una diferencia muy marcada en el porcentaje de rendimiento entre los dos solventes utilizados para la extracción MeOH y EtOH con porcentajes de rendimiento de 17.8% y 7% respectivamente, dejando ver que cada extracto poseen una composición química diferente lo cual puede generar efectos biológicos diferentes sobre los macrófagos.

## DISCUSIÓN

Las cepas de *M. bovis* tiene la capacidad de infectar a los macrófagos y sobrevivir dentro de ellos durante largos periodos. La actividad antimicobacteriana ha sido descrita en una gran cantidad de extractos provenientes de plantas medicinales, así también han demostrado poseer actividad inmunomoduladora que favorecen el control de la infección por parte de los macrófagos. Considerando los antecedentes se buscó analizar el efecto de los extractos del crucetillo sobre la cepa AN5 de *M. bovis* y sobre la respuesta inmunológica de los macrófagos infectados tomando en consideración que la respuesta inmunológica es clave para destruir las micobacterias, pero también es la causante del daño tisular observado en los pulmones en la fase avanzada de la tuberculosis (68,51). Por lo tanto, una regulación de la respuesta inmunológica podría ofrecer beneficios para disminuir el daño tisular observado en los pulmones de animales y seres humanos con tuberculosis.

Los resultados obtenidos mediante esta investigación aportan nuevos conocimientos científicos con respecto a las propiedades químicas y biológicas de los extractos del crucetillo (*R. aculeata*) y generan nuevas incógnitas interesantes de estudiar en futuras investigaciones. La obtención de extractos crudos a partir de los frutos del crucetillo con metanol y etanol mediante la técnica de maceración no se habían realizado hasta el momento por lo tanto los datos obtenidos en los porcentajes de rendimiento, el perfil fitoquímico y la cuantificación de fenoles totales son datos nuevos que podrán servir como base para la realización de nuevas investigaciones que ayuden a evaluar las propiedades terapéuticas de esta planta medicinal mexicana. Los resultados obtenidos en las pruebas de citotoxicidad son los primeros estudios *in vitro* donde se evalúa la actividad citotóxica de los extractos crudos de *R. aculeata* en macrófagos, por lo tanto, se generó información nueva de referencia para el planteamiento de futuras investigaciones. Los datos obtenidos en estas pruebas de citotoxicidad respaldan

de alguna manera los datos reportados por Pérez-Espinoza, 2003, quien reportó que la preparación etanólica tradicional de los frutos de *R. aculeata* no presenta toxicidad en ratones vía oral a dosis de 1000 mg/kg (14).

La ausencia de actividad antimicobacteriana en el extracto metanólico y etanólico de *R. aculeata* sobre la cepa *M. bovis* AN5 es un dato importante generado en la presente investigación, dejando información relevante para dirigir las futuras investigaciones hacia el estudio de otras propiedades terapéuticas de la planta distintas a la antimicobacteriana.

Los resultados observados en la infección de macrófagos son el tema que genera la mayor discusión de esta investigación al observar que los extractos están modificando de alguna manera el funcionamiento normal de los macrófagos, afectando los mecanismos destinados a controlar el crecimiento intracelular de la micobacteria. El estallido respiratorio en los macrófagos es un proceso clave para la destrucción y procesamiento de los agentes patógenos fagocitados, este mecanismo es considerado como un proceso proinflamatorio en el cual la participación de las especies reactivas de oxígeno, nitrógeno y citocinas proinflamatorias (IL-1B, IL-6 y TNF $\alpha$ ) es fundamental para la actividad microbicida de los macrófagos, (69–72). El complejo enzimático NADPH oxidasa, la enzima sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y las citocinas proinflamatorias son esenciales para estimular la producción de especies reactivas de oxígeno, nitrógeno y otros mediadores esenciales en el estallido respiratorio, la inhibición de algún de estos elementos o enzimas afecta negativamente la capacidad de los macrófagos para controlar y destruir a los microorganismos fagocitados (69–72).

La mayoría de los agentes antioxidantes encontrados en las plantas lo constituyen los compuestos fenólicos, flavonoides, flavonas, antocianidinas, cumarinas, lignanos, catequinas, isocatequinas que son moléculas químicas que ejercen sus efectos terapéuticos mediante; la quelación de metales como el hierro que participan en la producción de radicales libres a través de la reacción Fenton y Haber-Weiss, la neutralización directa de radicales libres, la inhibición de las enzimas iNOS (productora de NO), ciclooxigenasas (COX) y el complejo NADPH oxidasa (productor del anión superóxido); así como, la inhibición de citocinas proinflamatorias, todos estos sistemas son importantes para los macrófagos durante el estallido respiratorio y los procesos inflamatorios para la producción de especies reactivas (19,73–75). Los compuestos fenólicos y otros compuestos químicos presentes en los extractos del Crucetillo, podrían estar ejerciendo su actividad sobre alguna de las vías y enzimas anteriormente mencionadas, dando como resultado la alteración de la capacidad de los macrófagos para controlar el crecimiento intracelular de *M. bovis*, probablemente mediante un mecanismo de tipo antiinflamatorio. Concordando con la opinión de Gallardo-Casas, 2012, y de acuerdo con las observaciones encontrada en sus experimentos (12), los extractos del crucetillo (*R. aculeata*) deberían ser estudiados en futuras investigaciones en cuanto a lo referente a sus propiedades antiinflamatorias. Las propiedades antiinflamatorias han sido confirmadas en las otras plantas del mismo género; por ejemplo, en el extracto etanólico y acuoso de *R. spinosa* (22).

Por otro lado, el extracto metanólico de *R. dumetorum* demostró poseer actividad antiinflamatoria, antioxidantes, capacidad quelante de metales y capacidad de neutralizar el anión superóxido (18,19). Por lo tanto, es muy probable que los extractos de *R. aculeata* posean algunas propiedades medicinales similares a las otras plantas estudiadas.

Las conclusiones obtenidas son: El metanol es mejor solvente con respecto al etanol, para obtener un mayor porcentaje de rendimiento mediante la técnica de maceración. El extracto EtOH contienen una mayor cantidad de compuestos fenólicos totales por gramo que el extracto MeOH. Los extractos (MeOH y EtOH) de *R. aculeata* no posee actividad antibacteriana en contra de la cepa *M. bovis* AN5 a concentración de 400 µg/mL. Los extractos (MeOH y EtOH) del crucetillo no presentan actividad citotóxica en macrófagos J774A.1 en la concentración de 100 µg/mL. Los extractos no favorecen el control del crecimiento intracelular de *M. bovis* en macrófagos J774A.1 y por el contrario aumenta la supervivencia de la micobacteria, observándose una tendencia dosis dependiente en el extracto etanólico.

Las recomendaciones por realizar con base en los resultados obtenidos son; realizar investigaciones con ambos extractos en búsqueda de actividad antiinflamatoria, actividad antioxidante, actividad quelante de metales y realizar una evaluación sobre la inhibición de las enzimas ciclooxigenasas, lipooxigenasas, iNOS y el complejo NADPH oxidasa; así como también evaluar la inhibición de la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1B, IL-6, TNF $\alpha$  que son importantes en los procesos de inflamación y dolor. También se recomendaría realizar un fraccionamiento químico de cada extracto para aislar e identificar compuestos químicos en las fracciones que presenten mejores propiedades terapéuticas.

## REFERENCIAS

1. Mendoza N, De Leon Rodriguez J, Figueroa-Hernandez JL. *Herbolaria*. Actual Farmacol. 2004;1–3.
2. Velasco Lezama R, Tapia Aguilar R, Vega Avila E. Aspectos históricos para el uso de las plantas medicinales. *ContactoS*. 2004;51:11–20.
3. Aranda A, Viesca C, Sánchez G, Ramos de Viesca M, Sanfilippo J. La materia médica en el *Libellus de Medicinalibus Indorum*. *Rev la Fac Med UNAM*. 2003;46(1):12–7.
4. Muñetón P. Plantas medicinales: Un complemento vital para la salud de los mexicanos. Entrevista con el Dr. Erick Estrada Lugo. *Rev Digit Univ*. 2009;10(9):1–9.
5. Robles-Zepeda RE, Coronado-Aceves EW, Velazquez-Contreras CA, Ruiz-Bustos E, Navarro-Navarro M, Garibay-Escobar A. In vitro anti-mycobacterial activity of nine medicinal plants used by ethnic groups in Sonora, Mexico. *BMC Complement Altern Med*. 2013;13(329):1–6.
6. Jiménez-Arellanes MA, Cornejo-Garrido J, León-Díaz R. Las plantas medicinales mexicanas como fuente de compuestos antimicobacterianos. *Rev Mex Ciencias Farm*. 2010;41(1):22–9.
7. Jiménez-Arellanes MA, Gutiérrez-Rebolledo G, Rojas-Tomé S, Fischer MM-. Medicinal plants, an important reserve of antimycobacterial and antitubercular drugs: An update. *J Infect Dis Ther*. 2014;2(6):1–7.
8. Jimenez-Arellanes A, Meckes M, Ramirez R, Torres J, Luna-Herrera J. Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phyther Res*. 2003;17:903–8.
9. Gemechu A, Giday M, Ameni G, Worku A. In vitro anti-mycobacterial activity of selected medicinal plants against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains. *BMC Complement Altern Med*. 2013;13(291):1–6.
10. Andrade-Ochoa S, Nevárez-Moorillón GV, Sánchez-Torres LE, Villanueva-García M, Sánchez-Ramírez BE, Rodríguez-Valdez LM, et al. Quantitative structure-activity relationship of molecules constituent of different essential oils with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *BMC Complement Altern Med*. 2015;15(332):1–11.
11. Borhidi A, Diego-Pérez N. Flora de Guerrero No.35 Coussareae, Gardenieae, Naucleae, Rondeletieae (Rubiaceae). 1a. ed. Diego-Pérez N, Fonseca RM, editors. México (México): Facultad de Ciencias, UNAM; 2008.
12. Gallardo-Casas CA, Guevara-Balcázar G, Morales-Ramos E, Tadeo-Jiménez Y, Guitiérrez-Flores O, Jiménez-Sánchez N, et al. Ethnobotanic study of *Randia aculeata* (Rubiaceae) in Jamapa , Veracruz , Mexico , and its anti-snake venom effects on mouse tissue. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2012;18(3):287–94.
13. Tiburcio-Martínez M, Valadez-Omaña MT, Gallardo-Casas CA. Efecto coadyuvante del extracto etanólico de *Randia aculeata* con la foboterapia utilizada contra el veneno de *Bothrops asper* en la histología músculo esquelético . *Toxicol Exp*. 2003;1(1):34–42.
14. Pérez-Espinosa TP, Castillo-Hernández M del C, Valadez-Omaña MT, Gallardo-Casas CA. Evaluación toxicológica y efecto antinociceptivo en un modelo de dolor visceral del extracto etanólico de *Randia aculeata* (Crucetillo). *Rev Toxicol en línea*. 2003;1(1):50–7.
15. Lagunes Álvarez VM. Estudio de factibilidad técnico y económico de un agente coadyuvante al antídoto contra mordedura de serpientes de la especie *Bothrops asper* (Garman, 1884) y *Crotalus simus* (Latreille In Sonnini & Latreille, 1801) derivado del fruto de *Randia aculeata* L. Peralta Peláez LA, editor. Veracruz (Mex): Instituto Tecnológico de Veracruz; 2013.

16. Gulnaz AR, Moutawe-Abdelrhim MAEL, Chauhan JB. Antimicrobial , antioxidant activities and phytochemical analysis of ethanolic extract of *Randia uliginosa* leaves. *Int J Curr Microbiol Appl Sci.* 2014;3(6):1–12.
17. Mahabaleshwara K, Chandrasekhar N, Govindappa M. Phytochemical investigations of methanol leaf extracts of *Randia spinosa* using column chromatography, HPTLC and GC-MS. *Nat Prod Chem Res.* 2016;4(2):1–15.
18. Patel-Ritesh G, Pathak-Nimish L, Rathod-Jaimik D, Bhatt-Nayna M. Phytopharmacological properties of *Randia dumetorum* as a potential medicinal tree: An Overview. *J Appleid Pharm Sci.* 2011;1(10):24–6.
19. Gandhimathi S, Viji Stella Bai G. In vitro antioxidant activity of *Randia dumetorum* lam leaf extract. *Int J Herb Med.* 2013;1(4):107–11.
20. Gopi K, Renu K, Jayaraman G. Inhibition of *Naja naja* venom enzymes by the methanolic extract of *Leucas aspera* and its chemical profile by GC-MS. *Toxicol Reports [Internet].* 2014;1:667–73.
21. Tilloo SK, Bodhankar MM, Waikar SB, Pande VB. Antimicrobial activity of formulation containing bioactive extract of endocarp of *Randia spinosa*. *Int J Adv Pharm Biol Chem.* 2012;1(2):172–5.
22. Singh NK, Mishra AK, Gupta JK, Jayalakshmi S. *Randia spinosa* (Poir.): Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology : A review. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2010;4(1):127–31.
23. Shitaye JE, Tsegaye W, Pavlik I. Bovine tuberculosis infection in animal and human populations in Ethiopia: a review. *Vet Med (Praha).* 2007;52(8):317–32.
24. OIE. Manual de la OIE sobre animales terrestres. In: Oie, editor. OIE [Internet]. 2008. p. 1–15.
25. Norma Oficial Mexicana, NOM-031-ZOO-1994, Campaña nacional contra la tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*). 1995.
26. Health TC for FS& P. Tuberculosis Bovina. 2009;1–7.
27. Animal C de recursos de sanidad. Tuberculosis bovina.
28. Abalos P, Retamal P. Tuberculosis : ¿Una zoonosis re-emergente? *Rev Sci Tech.* 2004;23(2):583–94.
29. Carrisoza Urbina J, Flores Velázquez E, Guitierrez Reyes JA, Juárez López NO. Evaluación del grado de concordancia entre los resultados del examen histopatológico y del cultivo bacteriológico en el diagnóstico de tuberculosis en el diagnóstico de tuberculosis bovina en México. *Vet México OA.* 2015;2(3):1–12.
30. Kleeberg HH. Tuberculosis humana de origen bovino y salud pública. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 1984;3(1):55–76.
31. SAGARPA. Panorama de la leche en México. México; 2016.
32. Popoca EOF, Medellin AM, Trujillo HS, Falconi FQ, Durán NR. Presencia de *Mycobacterium* spp. en hatos lecheros del estado de México, México. Nota tecnica. *Rev Cient la Fac Ciencias Vet la Univ del Zulia.* 2011;21(1):39–42.
33. Portillo-Gómez L, Sosa-Iglesias EG. Molecular identification of *Mycobacterium bovis* and the importance of zoonotic tuberculosis in mexican patients. *Int J Tuberc Lung Dis [Internet].* 2011;15(10):1409–14.

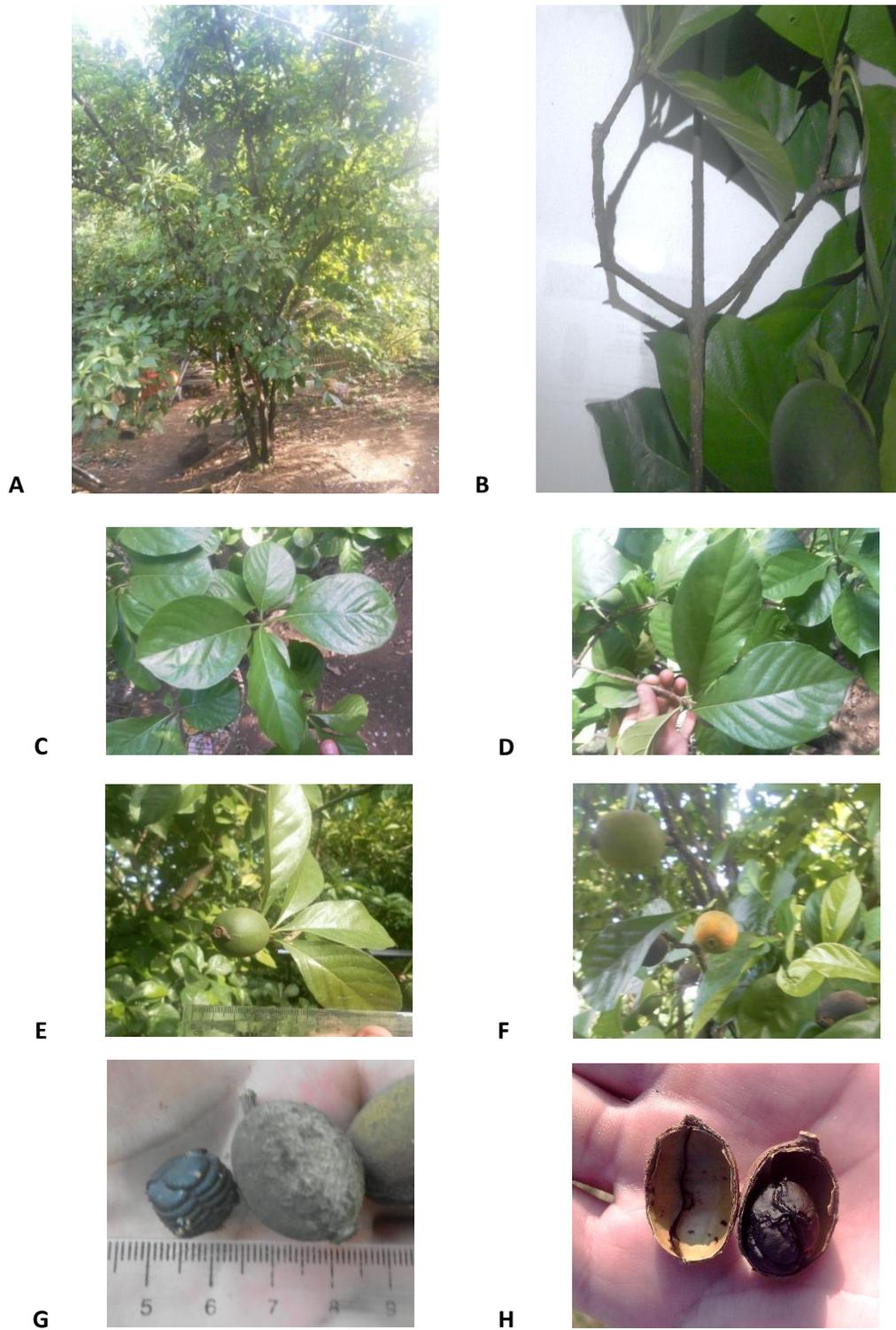
34. SAGARPA. Proyecciones para el sector agropecuario de Mexico. *Technol Soc.* 2014;23(April):1–38.
35. Herrera-León L, Pozuelo-Díaz R, Molina Moreno T, Valverde Cobacho A, Saiz Vega P, Jiménez Pajares MS. Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(9):496–502.
36. Torres-Gonzalez P, Cervera-Hernandez ME, Martinez-Gamboa A, Garcia-Garcia L, Cruz-Hervert LP, Bobadilla-Del Valle M, et al. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: a retrospective comparison with *Mycobacterium tuberculosis* in a Mexican tertiary care centre, 2000-2015. *BMC Infect Dis.* 2016;16(1):657.
37. Thoen CO, Lobue PA, Enarson DA, Kaneene JB, De Kantor IN. Tuberculosis: A re-emerging disease in animals and humans. *Vet Ital.* 2009;45(1):135–81.
38. OMS. Manual de bioseguridad en el laboratorio [Internet]. 3° ed. Ginebra, Suiza. Malta; 2005. 167-181 p.
39. Gorocica P, Jiménez-Martínez MDC, Garfias Y, Sada I, Lascurain R. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir.* 2005;18(2):142–53.
40. Minnikin DE, Y-C lee O, H. T. Wu H, Nataraj V, D. Donoghue H, Ridell M, et al. Pathophysiological implications of cell envelope structure in *Mycobacterium tuberculosis* and related Taxa. In: *Tuberculosis-Expanding Knowledge*. 1er ed. Colombia: INTECH open science/open minds; 2015. p. 145–75.
41. Keating LA, Wheeler PR, Mansoor H, Inwald JK, Dale J, Hewinson RG, et al. The pyruvate requirement of some members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is due to an inactive pyruvate kinase: Implications for in vivo growth. *Mol Microbiol.* 2005;56(1):163–74.
42. Cosivi O, Meslin FX, Daborn CJ, Grange JM. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans, with particular reference to Africa. *Rev Sci Tech.* 1995;14(3):733–46.
43. Bose M. Natural reservoir, zoonotic tuberculosis & interface with human tuberculosis: An unsolved question. *Indian J Med Res.* 2008;128(1):4–6.
44. Dean GS, Rhodes SG, Coad M, Whelan a O, Cockle PJ, Clifford DJ, et al. Minimum effective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect Immunity.* 2005;73(10):6467–71.
45. Mehta PK, Dharra R, Thakur Z. Cattle as Experimental Model to Study Immunopathogenesis of Tuberculosis. *Mycobact Dis.* 2017;7(3).
46. Pollock JM, Rodgers JD, Welsh MD, McNair J. Pathogenesis of bovine tuberculosis: The role of experimental models of infection. *Vet Microbiol.* 2006;112(2–4 SPEC. ISS.):141–50.
47. Hernandez-Pando R, Mata D, Aguilar D, Orozco H. Factores inmunológicos que participan en la progresión de la tuberculosis pulmonar. *Mensaje Bioquim.* 2011;35:1–16.
48. Pérez L, Milián F, Arriaga C, Romero C, Escartín M. Epidemiología molecular de la tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro. *Salud Publica Mex.* 2008;50(4):2–7.
49. García-Sancho MCE. Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis* . Una revisión de la literatura. *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir.* 2001;14(2):114–28.
50. Niedbala W, Wei X -q., Campbell C, Thomson D, Komai-Koma M, Liew FY. Nitric oxide preferentially induces type 1 T cell differentiation by selectively up-regulating IL-12 receptor 2 expression via cGMP. *Proc Natl Acad Sci [Internet].* 2002;99(25):16186–91.

51. Hernández-Pando R, Orozco E H, Aguilar L D, López Casillas F, Rook G. Immunopatología de la tuberculosis pulmonar experimental. *Mensaje Bioquim.* 2004;28:129–53.
52. Pasquinelli V. Contribución de la respuesta inmune del huésped al control de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. *Quim viva.* 2008;2:135–59.
53. Szabo BSJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of the Interleukin (IL)-12R B2 Subunit Expression in Developing T Helper 1 (Th1) and Th2 Cells. 1997;185(5).
54. Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2012;12(5):352–66.
55. Salgame P. MMPs in tuberculosis: granuloma creators and tissues destroyers. *J Clin Invest.* 2016;(13):9–11.
56. Animal T, Bulletin D. Bovine tuberculosis at the animal – human – ecosystem interface. 2010;2–11.
57. De La Iglesia AI, Morbidoni HR. Mecanismos de acción y de resistencia a rifampicina e isoniacida en *Mycobacterium tuberculosis*: Nueva información sobre viejos conocidos. *Rev Argent Microbiol.* 2006;38(2):97–109.
58. Coll P. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(8):474–80.
59. Retamal M P, Martínez T MA, Abalos P P. Secuencias de inserción IS6110 e IS1081 en cepas de *Mycobacterium bovis* provenientes de bovinos beneficiados en la Región Metropolitana. *Rev Chil infectología.* 2003;20(3):166–70.
60. WHO. Global tuberculosis report 2016. 2016.
61. Shah NP, Singhal A, Jain A, Kumar P, Uppal SS, Srivatsava MVP, et al. Occurrence of overlooked zoonotic tuberculosis : Detection of *Mycobacterium bovis* in human cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 2006;44(4):1352–8.
62. De Kantor IN, Torres PM, Morcillo N, Imaz MS, Sequeira MD. La tuberculosis zoonótica en la Argentina. *Med Buenos Aires.* 2012;72:514–20.
63. Kulathuran Pillai K, Chidambaranathan N, Mohamed Halith M, Jayaprakash S, Narayanan N. Hepatoprotective activity of *Cnidoscopus chayamansa* against rifampicin and isoniazide induced toxicity in wistar rats. *Res J Pharm Biol Chem Sci.* 2012;3(2):577–85.
64. Shih T-Y, Young T-H, Lee H-S, Hsieh C-B, Hu OY-P. Protective effects of kaempferol on isoniazid- and rifampicin-induced hepatotoxicity. *AAPS J.* 2013;15(3):753–62.
65. Jiménez-Arellanes A, Luna-Herrera J, Cornejo-Garrido J, López-García S, Castro-Mussot ME, Meckes-Fischer M, et al. Ursolic and oleanolic acids as antimicrobial and immunomodulatory compounds for tuberculosis treatment. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13.
66. López-García S, Castañeda-Sánchez JI, Jiménez-Arellanes A, Domínguez-López L, Castro-Mussot ME, Hernández-Sánchez J, et al. Macrophage activation by ursolic and oleanolic acids during mycobacterial infection. *Molecules.* 2015;20:14348–64.
67. Luna-Herrera J, Martínez-Cabrera G, Parra-Maldonado R, Enciso-Moreno J a, Torres-López J, Quesada-Pascual F, et al. Use of receiver operating characteristic curves to assess the performance of a microdilution assay for determination of drug susceptibility of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003;22(1):21–7.

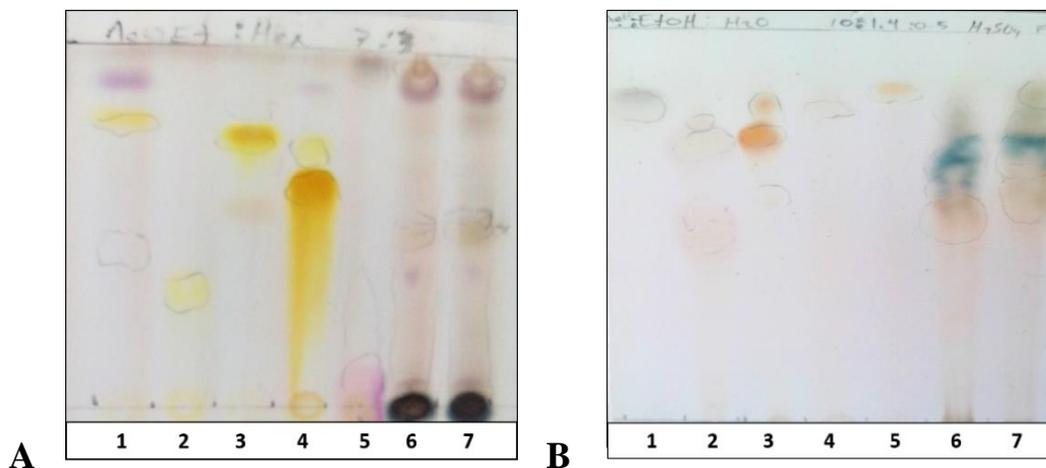
## REFERENCIAS

68. Elkington PT, Ugarte-Gil CA, Friedland JS. Series “matrix metalloproteinases in lung health and disease”: Matrix metalloproteinases in tuberculosis. *Eur Respir J.* 2011;38(2):456–64.
69. Chávez-Galán L, Arenas-Del Ángel M del C, Sada-Ovalle I, Lascurain R. Principales mecanismos de evasión de la respuesta inmune por *Mycobacterium tuberculosis*. *Gac Méd Méx.* 2009;145(4):3233–330.
70. Cascales Angosto M. Estallido respiratorio de los fagocitos. *An la Real Acad Nac Farm.* 2005;71(2):365–86.
71. Espa E. Conceptos básicos en inmunología : células efectoras y la respuesta inmunitaria innata. In: Elsevier, editor. *Inflamacion intraocular y uveítis.* España; 2013. p. 5–28.
72. López-Urrutia Lorente L. Inducción de la producción de óxido nítrico por lipopolisacárido de *Brucella* en macrófagos de rata [Internet]. *Universida.* España; 2000. 33-35 p.
73. Gutierrez Guerrero M del C. Estudio de efecto de las propiedades quelantes de los flavonoides sobre su capacidad antioxidante total. *Universidad Auntonoma de Queretaro;* 2008. p.1-108
74. Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp.* 2002;17(6):271–8.
75. Leyva-López N, Gutierrez-Grijalva EP, Ambriz-Perez DL, Basilio Heredia J. Flavonoids as cytokine modulators: A possible therapy for inflammation-related diseases. *Int J Mol Sci.* 2016;17(6):1-15.

## IMÁGENES



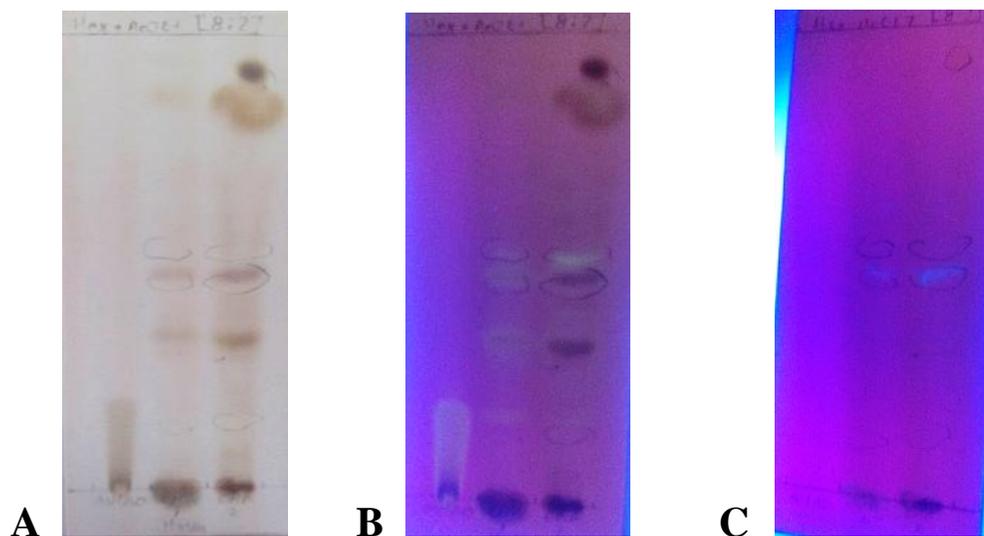
**Imagen 1. El Crucetillo *Randia aculeata*.** Se muestran las fotografías de las principales partes del Árbol. A) Árbol; B) Rama; C y D) Hojas; E y F) Frutos en diferentes etapas de maduración; G) Fruto maduro y semillas; H) Fruto seco seccionado por la mitad.



**Fase móvil:** Acetato de etilo: Hexano. 7:3  
**Fase estacionaria:** Silica gel 60 F254, Fase normal  
**Revelador:** Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 10%.  
**1:** Narigenina  
**2:** Amentoflavona  
**3:** Caemferol  
**4:** Quercetina  
**5:** Acido clorogénico  
**6:** Extracto MeOH  
**7:** Extracto EtOH

**Fase móvil:** Acetato de etilo: Etanol: Agua. 10: 1.4: 0.5  
**Fase estacionaria:** Silica gel 60F254, Fase normal  
**Revelador:** Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 10%.  
**1:** Ácido cafeico  
**2:** Ácido clorogénico  
**3:** Rutina  
**4:** Ácido gálico  
**5:** Caemferol  
**6:** Extracto MeOH  
**7:** Extracto EtOH

**Imagen 2. Cromatogramas de los extractos obtenidos a partir de los frutos de *Randia aculeata*. A) Búsqueda de flavonoides; B) Búsqueda de compuestos fenólicos.**



**Fase móvil:** Hexano: Acetato de etilo 8:2

**Fase estacionaria:** Silica gel 60F254, Fase normal.

**Revelado:** Ácido sulfúrico H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

**1:** Ácido ursólico/Ácido oleanólico.

**2:** Extracto MeOH

**3:** Extracto EtOH

**Fase móvil:** Hexano: Acetato de etilo 8:2

**Fase estacionaria:** Silica gel 60F254, Fase normal.

**Revelado:** Ácido sulfúrico H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

**1:** Ácido ursólico/Ácido oleanólico.

**2:** Extracto MeOH

**3:** Extracto EtOH

**Fase móvil:** Hexano: Acetato de etilo 8:2

**Fase estacionaria:** Silica gel 60F254, Fase normal.

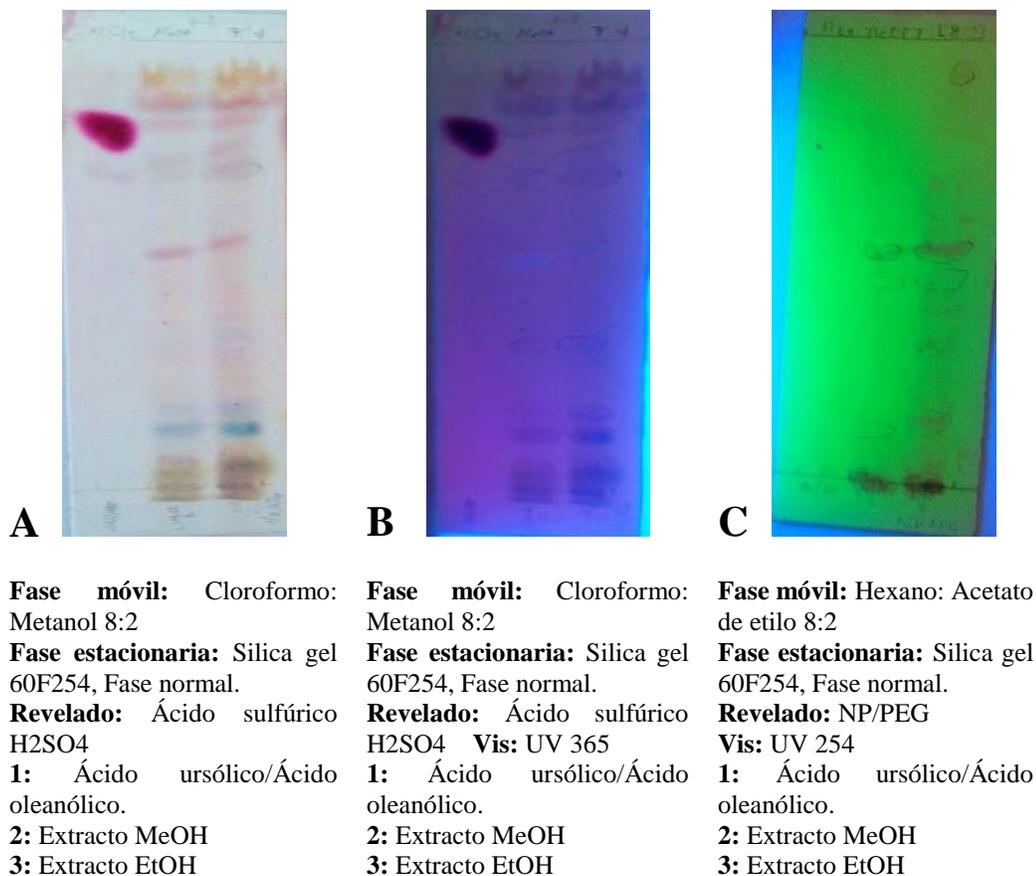
**Revelado:** Ácido sulfúrico H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

**1:** Ácido ursólico/Ácido oleanólico.

**2:** Extracto MeOH

**3:** Extracto EtOH

**Imagen 3. Cromatogramas de los extractos obtenidos a partir de los frutos de *Randia aculeata*.** La imagen muestra las fotografías de las placas cromatográficas obtenidas con el mismo sistema de elución, pero visualizado a diferente longitud de onda. A) Visualización simple; B) Visualización con UV 365 nm; C) Visualización UV254 nm

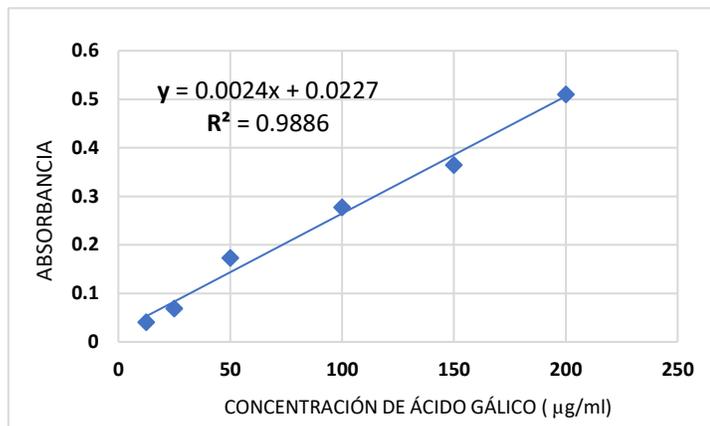


**Imagen 4. Cromatogramas de los extractos obtenidos a partir de los frutos de *Randia aculeata*.** La imagen muestra las fotografías de las placas cromatográficas obtenidas con diferentes sistemas de elución y diferente agente revelador.

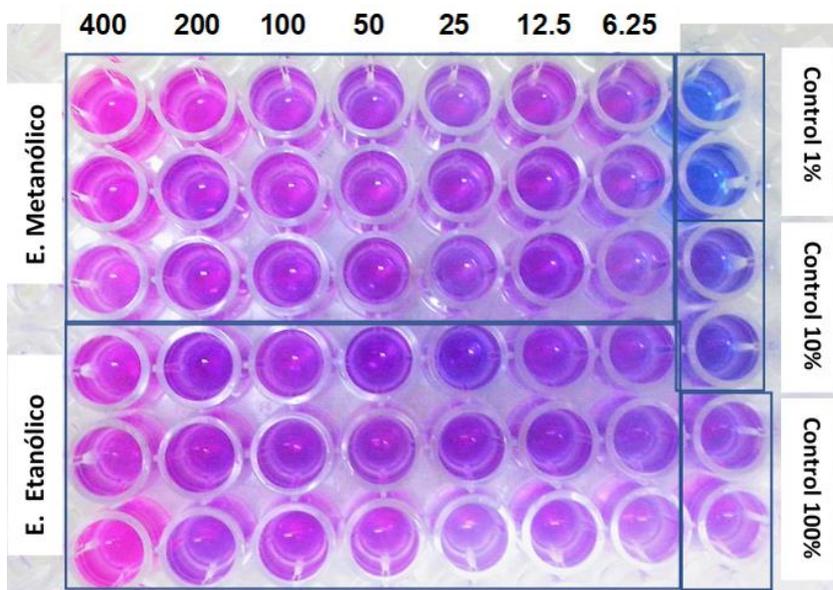
## FIGURAS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua
B	Agua	100 µl de extracto MeOH a 1,600 µg/ml							Control al 1%	Agua	Agua	Agua
C	Agua									Agua	Agua	Agua
D	Agua								Control al 10%	Agua	Agua	Agua
E	Agua	100 µl de extracto EtOH a 1,600 µg/ml							Control al 100%	Agua	Agua	Agua
F	Agua									Agua	Agua	Agua
G	Agua								Agua	Agua	Agua	
H	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua

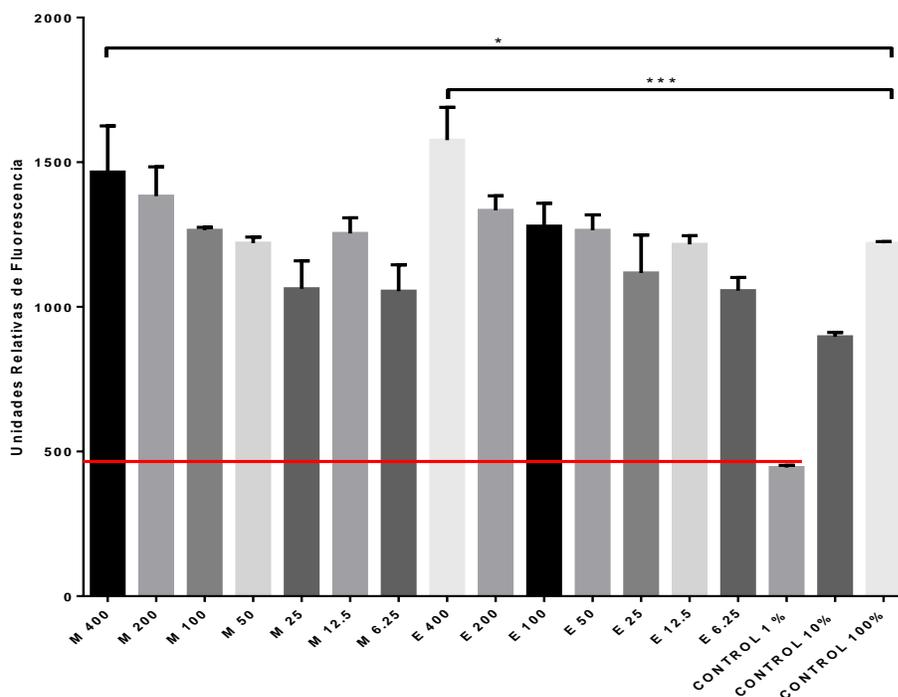
**Figura 1. Colocación de compuestos en la placa de 96 pozos al determinar la actividad antimicobacteriana de los extractos.** En la imagen se muestra la ubicación de los compuestos en la determinación de la CMI. A continuación se describe la serie de pasos que se empleó para realizar el experimento: 1-Colocar 200 µL de agua estéril en los pozos de la periferia y no utilizados; 2-Colocar 100 µL de medio 7H9-complementado en todos los pozos de las columnas 2-8 desde la fila B hasta la G; 3-Colocar 100 µL de una solución de medio 7H9-complementado que contiene el extracto MeOH a concentración 4X (1,600 µg/mL) en los pozos (2B,2C,2D); 4-Colocar 100 µL de una solución de medio 7H9-complementado que contiene el extracto EtOH a concentración 4X (1,600µg/mL) en los pozos (2E,2F,2G). Realizar diluciones dobles seriadas transfiriendo 100 µL de columna en columna desde la columna 2 hasta la columna 8 y eliminar los 100 µL restantes. 5-Colocar 100 µL de una suspensión bacteriana de la cepa AN5 de *M. bovis* (previamente ajustada al tubo No.1 de McFarland y diluida 1:20 en medio 7H9-Complementado) en todos los pozos de las filas B-G desde la columna 2 hasta la 8; 6-Colocar 2 µL de la suspensión bacteriana ajustada y 198 µL de medio 7H9-Complementado en los pozos 9B y 9C. (Control del crecimiento bacteriano al 1%); 7-Colocar 10 µL de la Suspensión bacteriana ajustada y 190 µL medio 7H9-complementado en los pozos 9D y 9E. (Control del crecimiento bacteriano al 10%); 8-Colocar 100 µL de la Suspensión bacteriana ajustada y 100 µL medio 7H9-Complementado en los pozos 9F y 9G (Control del crecimiento bacteriano al 100%).



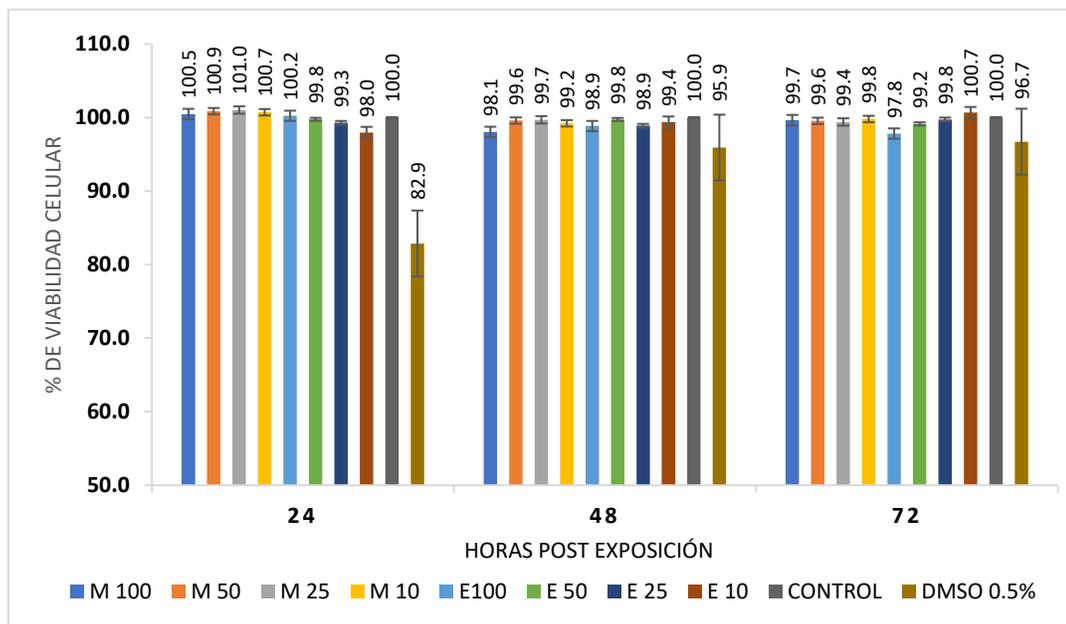
**Figura 2.** Curva estándar de ácido gálico utilizada para el cálculo de fenoles totales en los extractos. Los datos graficados representan la media de cuatro mediciones realizadas a longitud de 765 nm. La ecuación y  $R^2$  fueron calculadas mediante regresión lineal.



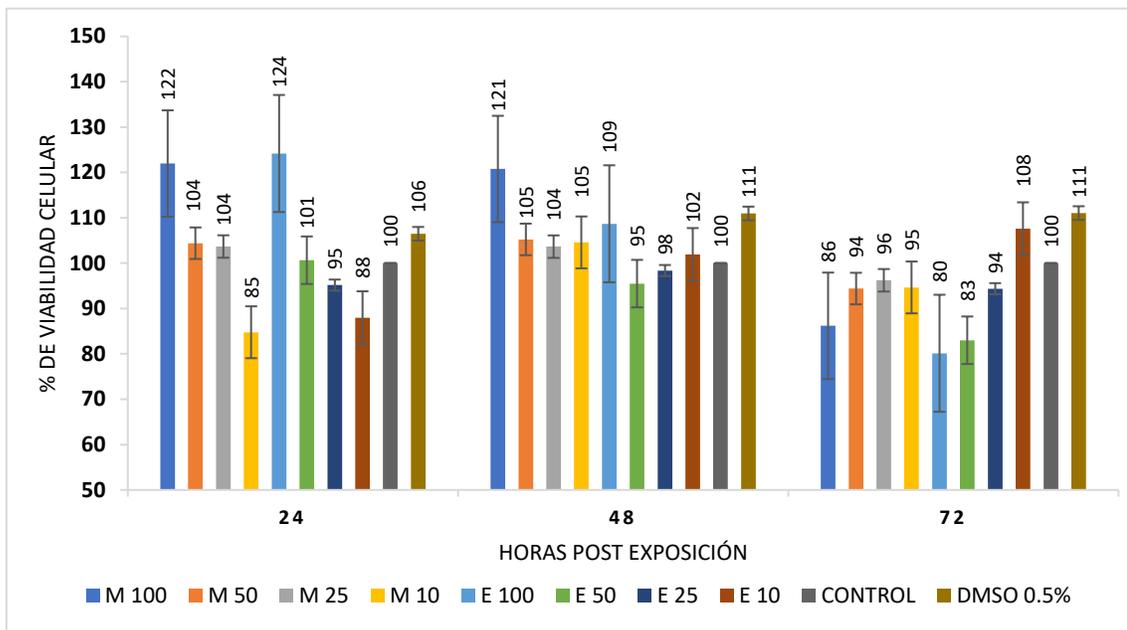
**Figura 3.** Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos de *Randia aculeata* mediante el ensayo MABA. En la placa fue sembrada la cepa AN5 de *M. bovis* e inmediatamente fueron agregados en los pozos diferentes concentraciones de los extractos de *R. aculeata*, 6 días después fue colocado el reactivo (resazurina) para 24 horas después realizar la determinación de la concentración mínima visualmente. Se muestra la foto de la placa de con los resultados obtenidos a las 24 horas posteriores de la colocación del reactivo. E= Extracto; E. Metanólico a concentración de 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 µg /mL; E. Etanólico a concentración de 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 µg /mL; Control= Control de crecimiento bacteriano al 1%, 10% y 100%. La prueba fue repetida tres veces.



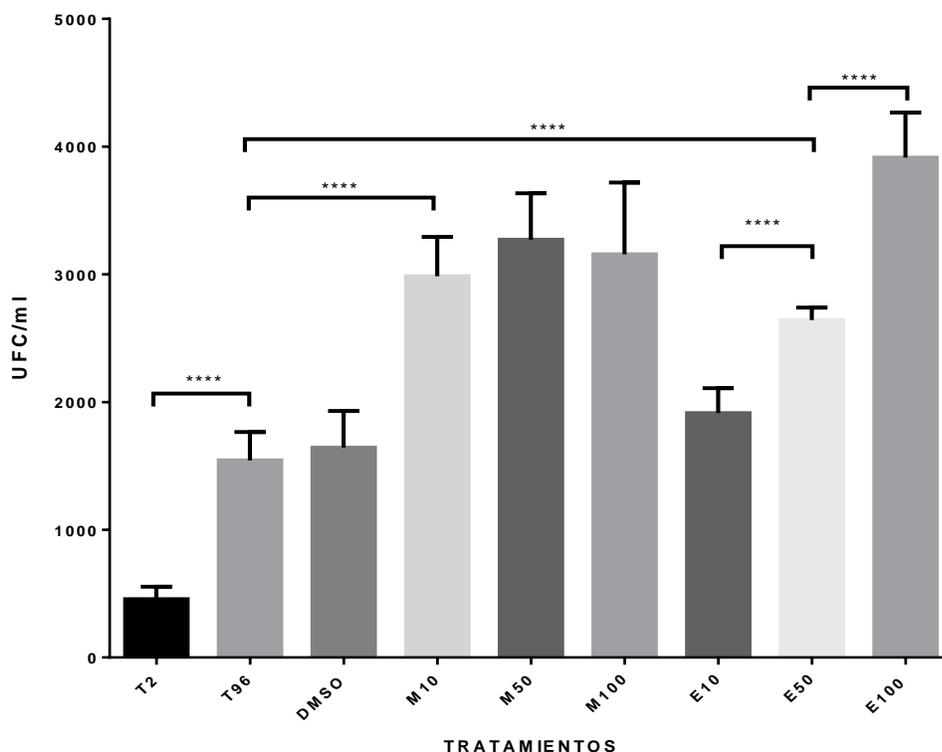
**Figura 4. Fluorescencia emitida en la placa al momento de determinar la CMI de los extractos.** La placa utilizada para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos fue estimulada a una longitud de onda de 544nm para realizar la medición de la fluorescencia en los pozos. M= Extracto Metanólico de a concentración de 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; E= Extracto Etanólico a concentración de 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Control= Control de crecimiento bacteriano al 1%, 10% y 100%. Se muestran graficados los valores promedio de fluorescencia de cada grupo y su respectiva desviación estándar. Los datos fueron obtenidos a partir de dos replicas con tres repeticiones. La línea en la gráfica indica aproximadamente el límite máximo de fluorescencia que se esperaba obtener para establecer una posible concentración mínima inhibitoria de los extractos. El asterisco representa diferencia estadística entre los grupos (\* $P < 0.05$ ); calculado con ANOVA de una vía y Prueba de Dunnett's.



**Figura 5. Citotoxicidad de los extractos evaluada en macrófagos J774.A1 mediante el método de azul de tripano.** Diferentes concentraciones de los extractos de *R. aculeata* fueron agregados en el medio de cultivo para evaluar la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas post exposición. M= Extracto metanólico (MeOH) a concentración de 100, 50, 25, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; E= Extracto Etanólico (EtOH) a concentración de 100, 50, 25, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Control= Grupo de células sin tratamiento; DMSO= Grupo de células con Dimetilsulfóxido al 0.5%. Se muestran el promedio de cada grupo expresado en porcentaje y su respectivo error típico, calculado mediante el conteo de 120 células en cuatro campos por pozo y considerando el valor promedio del grupo control de cada tiempo como el 100%. Datos obtenidos a partir de dos replicas con tres repeticiones.



**Figura 6. Citotoxicidad de los extractos evaluada en macrófagos J774.A1 mediante el método de resazurina.** Diferentes concentraciones de los extractos de *R. aculeata* fueron agregados en el medio de cultivo para evaluar la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas post exposición. M= Extracto metanólico (MeOH) a concentración de 100, 50, 25, 10 µg /mL; E= Extracto Etanólico (EtOH) a una concentración de 100, 50, 25, 10 µg /mL; Control= Grupo de células sin tratamiento; DMSO= Grupo de células con Dimetilsulfóxido al 0.5%. Se muestran el promedio de cada grupo expresados en porcentaje y su respectivo error típico, calculado mediante el valor promedio de la fluorescencia obtenido en cada grupo y considerando el valor promedio del grupo control de cada tiempo como el 100%. Datos obtenidos a partir de dos replicas con tres repeticiones.



**Figura 7. Ensayo de killing para evaluar el efecto inmunomodulador de los extractos de *Randia aculeata*.** Los macrófagos JJ74A.1 fueron infectados con la cepa AN5 de *M. bovis* y posteriormente fueron tratados con diferentes concentraciones de los extractos de *R. aculeata*, las cantidades de micobacterias intracelulares fue determinada a las 2 y 96 horas post infección. M= Extracto metanólico (MeOH) a concentración de 10, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; E= Extracto Etanólico (EtOH) a concentración de 10, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; T2= Grupo control a las 2 horas post infección; T96= Grupo control a las 96 horas post infección; DMSO= Grupo de células con Dimetilsulfóxido al 0.5%; Se muestra graficado el promedio y la desviación estándar de cada grupo. Datos obtenidos a partir de tres replicas con tres repeticiones. El asterisco representa la significancia estadística entre los grupos (\* $P < 0.05$ ); calculado con ANOVA de una vía y Prueba de Tukey.

## CUADROS

**Cuadro 1.** *Rendimiento de los extractos obtenidos a partir de los frutos de Randia aculeata*

Disolvente utilizado	Cantidad de materia vegetal usada (g)	Cantidad de extracto obtenido (g)	Rendimiento (%)
Metanol	92.1	16.38	17.8
Etanol	92.6	6.46	7.0

*Nota:* g= Gramos

**Cuadro 2.** *Cantidad de fenoles totales presentes en los extractos de Randia aculeata*

Concentración del Extracto (mg/ml)	Extracto MeOH <sup>a</sup> ( $\mu\text{g EAG} \pm \text{DS}$ )	Extracto EtOH <sup>a</sup> ( $\mu\text{g EAG} \pm \text{DS}$ )
2.0	$45.2 \pm 0.78$	$141.6 \pm 1.07$
1.5	$33.5 \pm 4.00$	$102.6 \pm 1.14$
1.0	$23.5 \pm 0.40$	$66.9 \pm 2.56$

*Nota:* MeOH= Metanólico; EtOH= Etanólico. Los datos mostrados representan la media  $\pm$  la desviación estándar (DS) de cuadro mediciones.

<sup>a</sup> El contenido de fenoles totales se encuentra expresado en microgramos equivalentes de ácido gálico ( $\mu\text{g EAG}$ ).

**Información de contacto:**

Nelson Daniel García Cruz.

ndanielunam@outlook.com